

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Ida BERNIER

1^{re} THÈSE :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES PROTEINES.

A) MODIFICATION DES PROTEINES PAR VOIE CHIMIQUE.

B) ETUDE DE LA COUPURE SPECIFIQUE DES PROTEINES PAR VOIE CHIMIQUE AU NIVEAU DES RESIDUS DE TRYPTOPHANE.

2^e THÈSE :

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

27 MARS 1963 / devant la Commission d'examen

M. LEDERER

Président

M. TONNELAT

M. CLAUSER

} Examinateurs

I M P R I M E R I E

R. FOULON & C^{ie}

29, RUE DEPARCIEUX. 29

PARIS — 1963

Série A, N° 4.031
N° d'ordre : 4.882

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Ida BERNIER

1^{re} THÈSE :

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DES PROTEINES.

A) MODIFICATION DES PROTEINES PAR VOIE CHIMIQUE.

B) ETUDE DE LA COUPURE SPECIFIQUE DES PROTEINES PAR VOIE CHIMIQUE AU NIVEAU DES RESIDUS DE TRYPTOPHANE.

2^e THÈSE :

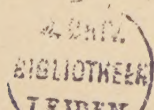
Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

devant la Commission d'examen

M. LEDERER	Président
M. TONNELAT	} Examinateurs
M. CLAUSER	

IMPRIMERIE
R. FOULON & C^{ie}
29, RUE DEPARCIEUX, 29
PARIS — 1963



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure	EICHHORN	T	Botanique
DE BROGLIE ...	T	Théories physiques	DE CUGNAC ...	T	Biologie végétale (S.P.C.N.)
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées	Mlle CAUCHOIS .	T	Chimie physique
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés	THELLIER	T	Physique du Globe
PRÉVOST	T	Chimie organique	L'HÉRITIER	T	Biologie générale (Orsay)
CHAUDRON	T	Chimie appliquée	GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
WYART	T	Minéralogie et Cristallographie	PONCIN	T	Mécanique générale
TEISSIER	T	Zoologie	DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay)	QUELET	T	Chimie organique
AUGER	T	Physique quantique et Relativité	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
MONNIER	T	Physiologie générale	CHAMPETIER ...	T	Chimie macromoléculaire
PIVETEAU	T	Paléontologie	CUVILLIER	T	Micropaléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)	JUNG	T	Pétrographie
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)	TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique
LAFFITTE	T	Chimie générale	WIEMANN	T	Chimie organique et structurale
FAVARD	T	Géométrie supérieure	JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
COULOMB	T	Physique du Globe	VASSY	T	Physique de l'atmosphère
Mlle COUSIN ...	T	Biologie animale (S.P.C.N.)	DESTOUCHES ...	T	Théories physiques
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale	AMIEL	T	Chimie générale
DRACH	T	Zoologie	HOCART	T	Minéralogie et Cristallographie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)	I.-P. MATHIEU .	T	Physique (Optique)
ÉPHRUSSI	T	Génétique	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
RIVIÈRE	T	Géologie S.P.C.N. et sédim.	MAY	T	Zoologie (Orsay)
GAUTHERET ...	T	Biologie végét. (P.C.B.)	CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologie
R. LUCAS	T	Recherches physiques	FELDMANN	T	Biologie végétale marine
A. THOMAS ...	T	Biologie cellulaire	GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay)
ARNULF	T	Optique appliquée	JOST	T	Physiologie comparée
MORAND	T	Physique Enseignement	FORTET	T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)	SCHWARTZ	T	Calcul différentiel et Intégral
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides	CHOUARD	T	Physiologie végétale
DANJON	T	Astronomie	MALAVARD	T	Aviation (Technique aéronautique)
PETIT	T	Biologie maritime	BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique	NORMANT	T	Synthèse organique générale
GALLIEN	T	Embryologie			

BÉNARD T Chimie minérale
 BUVAT T Botanique (E.N.S.)
 DUGUÉ T Statistiques mathématiques
 SOULAIRAC T Psychophysiologie
 ULRICH T Physiologie végétale
 MARÉCHAL T Optique théorique et appliquée
 KIRRMANN T Théories chimiques
 CHADEFAUD T Botanique
 Mlle LE BRETON T Physiologie de la nutrition
 SALEM T Mathématiques générales
 LELONG T Application de l'analyse à la géométrie
 DEVILLERS T Anatomie et Histologie comparées
 EHRESMANN T Topologie algébrique
 FRANÇON T Physique (S.P.C.N.)
 GLANGEAUD T Géographie physique et Géologie dynamique
 GODEMENT T Mathématiques (M.P.C.)
 PISOT T Technique Mathém. de la Physique
 ROCH T Géologie
 SCHATZMAN T Astrophysique
 TERMIER T Paléontologie stratigraphique
 ZAMANSKY T Mathématiques générales
 LENNUIER T Physique (M.G.P.)
 RIZET T Génétique (Orsay)
 ROUTHIER T Géologie appliquée
 Mme TONNELAT T Physique théorique
 DIXMIER T Mathématiques (M.P.C.)
 SOUCHAY T Chimie générale
 AIGRAIN T Electrotechnique générale
 BRUSSET T Chimie systématique
 M. LÉVY T Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
 Mme CHAIX T Chimie biologique
 Mme HUREL-PY T Biologie végétale (P.C.B.)
 PIALIX T Chimie (M.P.C.)
 BRUN T Mécanique théorique des fluides
 LEDERER T Chimie biologique
 Mme DUBREIL T Mathématiques (Agrég.)
 Mme LELONG T Mathématiques (E.N.S.)
 BELLAIR T Géologie (S.P.C.N.)
 COTTE T Physique électricité
 J.-E. DUBOIS T Chimie organique
 LAMOTTE T Zoologie (E.N.S.)
 A. MICHEL T Chimie minérale (Orsay)
 OLMER T Energétique générale
 ROUAULT T Electricité (Orsay)
 GAUTHIER T Mécanique appliquée
 BARCHIEWITZ T Chimie physique
 BROSSSEL T Physique atomique
 BUSER T Physiologie comparée
 CAMUS T Physiologie végétale (B.M.P.V.)
 CASTAING T Physique (Orsay)
 CURIEN T Minéralogie et Cristallographie

MOYSE T Physiologie végétale (Orsay)
 NOIROT T Evolution des Etres org.
 PANNETIER T Chimie générale (Orsay)
 POSSOMPES T Zoologie
 PULLMANN T Chimie théorique
 TEILLAC T Physique nucléaire et Radioactivité
 TONNELAT T Biologie physico-chimique
 VILLE T Econométrie
 WILLEMART Chimie (P.C.B.)
 DODE T Chimie (Orsay)
 FREYMANN T Recherches physiques
 GUINOCHE T Biol. vég. S.P.C.N. (Orsay)
 ROLLET T Chimie (P.C.B.)
 Mlle JOSIEN T Chimie (S.P.C.N.)
 CHEVALLEY T Géométrie algébrique et théorie des groupes
 ARNOULT T Electronique (Orsay)
 CHAPELLE T Physique (Orsay)
 DELANGE T Mathématiques (Orsay)
 DENY T Mathématiques générales (Orsay)
 GERMAIN T Mécanique théorique des fluides
 G. LUCAS T Géologie
 ALLARD T Chimie physique
 BERTHELOT T Physique fondament. des hautes énergies (Orsay)
 BRICARD T Météorologie et Physique de l'Atmosphère
 Mme ALBE-
 FESSARD T Psychophysiologie
 FRIEDEL T Physique des Solides (Orsay)
 M. JULIA Etudes des Moléculaires naturelles complexes
 LENDER T Biologie animale (S.P.C.N., Orsay)
 MAGAT Physico-chimie des radioéléments
 Mlle QUINTIN T Electrochimie
 MONOD T Chimie du métabolisme
 BENOIT T Physiol. anim. (Orsay)
 DE POSSEL T Analyse numérique
 CHARLOT T Chimie analytique
 HAÏSSINSKY T Radiochimie
 LEMÉE T Physiol. vég. B.M.P.V. (Orsay)
 GUÉRIN T Chimie M.P.C. (Orsay)
 M. CHATELET Chimie (P.C.B.)
 JEAN T Physique nucl. (Orsay)
 MATTTLER T Physique S.P.C.N. (Orsay)
 L. MICHEL Phys. théor. des Hautes Energies (Orsay)
 BERGERARD T Zoologie (Orsay)
 BERTIN T Electronique (Orsay)
 BOUSSIÈRES Chimie des Radioéléments (Orsay)
 Mme COUTURE T Thermodynamique et Mécanique physique

ELLENBERGER ..	T	Géologie appliquée sur le terrain	Mlle VEIL	Physiologie générale
FRANC		Biologie animale (P.C.B.)	LWOFF	T Microbiologie
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)	SIESTRUNCK ...	T Mécanique physique et expérimentale
STOLKOWSKI ...		Physiologie générale	LACOMBE	T Métallurgie des métaux nucléaires
ACHER		Chimie biologique (Orsay)	BROCHARD	T Physique P.C.B. (Orsay)
BAUDOIN		Biologie animale (P.C.B.)	CABANNES	T Mécanique générale
BEAUMONT		Biologie animale (S.P.C.N.)	LESIEUR	T Mathématiques M.P.C. (Orsay)
BLAMONT	T	Géophysique Ionosphère	MAZET	T Mécanique générale (Orsay)
BOURREAU		Botanique	CAIRE	Géographie physique et Géologie dynamique
D. CURIE		Physique (M.G.P.)	COMOLET	T Mécanique des fluides
DURAND-DELGA .		Géologie	CORABCEUF	Physiologie animale
FREON	T	Chimie organ. (Orsay)	DELLOUE	Physique de l'exosphère
HELLER	T	Physiologie végétale	GORENFLOT ...	Botanique II (Orsay)
TORTRAT	T	Calcul des probabilités	HOUILLOIN	Biologie animale (P.C.B.)
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.)	J. JULLIEN	Chimie (P.C.B.)
MAGNAN	T	Physique (S.P.C.N.)	MALGRANGE ...	T Tech. math. de la Phys.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire	OLIVIER	Anthropologie
Mlle FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.)	NOZERAN	T Botanique II (Orsay)
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste	BLANC-LAPIERRE	Physique E.N.S. (Orsay)
			CHEVANGEONT ..	T Botanique (Orsay)
			KAHANE	T Mathématiques (Orsay)
			SAMUEL	T Math. E.N.S. féminine
			KOURGANOFF ..	T Astronomie (Orsay)
			THIRY	T Mécanique céleste

Secrétaire général R. POUILLAIN

INTRODUCTION



Digitized by the Internet Archive
in 2026

L'établissement de la structure primaire d'une protéine fait appel à des méthodes de scission enzymatiques et chimiques.

L'emploi des enzymes protéolytiques a pris une importance considérable dans la chimie des protéines depuis les travaux fondamentaux de SANGER sur l'insuline [1]. Il avait pu vérifier, pour la première fois sur une protéine, les conclusions de BERGMANN et FRUTON [2] sur la spécificité des enzymes protéolytiques qu'ils avaient mise en évidence au cours de leurs études avec des substrats synthétiques. Cette spécificité est très étroite dans le cas de la trypsine [3] qui ne scinde que des liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques de l'arginine et de la lysine. La chymotrypsine possède une spécificité moins marquée [3]. Elle coupe la chaîne polypeptidique au niveau des résidus de phénylalanine, de tyrosine et de tryptophane, mais fréquemment aussi au niveau des groupements carboxyliques d'un acide aminé avec un reste neutre assez long (leucine). La pepsine, la papaïne et la subtilisine sont d'autres endopeptidases [3] fréquemment utilisées pour la dégradation des protéines, mais leur spécificité est peu marquée.

Nous venons de rappeler brièvement les principales caractéristiques des endopeptidases couramment utilisées dans l'étude de la structure des protéines. Il est à prévoir, en outre, que le nombre des enzymes protéolytiques spécifiques utilisables à des fins analytiques ira en s'accroissant, dès qu'il sera possible de les préparer à l'état pur. Parmi ces derniers, on compte des enzymes intracellulaires comme les cathepsines [4], les protéases végétales [5], les protéases bactériennes [6, 6a] et certains venins de serpents [7].

A côté des endopeptidases, la carboxypeptidase [3] et la leucine-aminopeptidase [3] jouent un rôle important dans l'étude de la structure des protéines. On les désigne sous le nom d'exopeptidases, en raison de leur activité enzymatique uniquement réservée à l'attaque des acides aminés C- et N-terminaux d'une chaîne polypeptidique.

Pour établir l'enchaînement des acides aminés au sein d'une protéine, par la seule méthode enzymatique, il est nécessaire de faire intervenir plusieurs enzymes pour la dégradation spécifique de la molécule. On obtient ainsi un mélange de peptides plus ou moins

longs, caractérisés par leurs acides aminés C- et N-terminaux. Finalement se fera le travail le plus délicat : le regroupement des fragments peptidiques, en tenant compte des séquences qui se chevauchent, pour remonter ainsi à l'enchaînement total des acides aminés au sein de la molécule primitive.

Ces moyens d'investigations, désormais classiques, ont déjà permis d'établir la structure chimique complète de l'insuline [8], de la corticotropine [9], de la ribonucléase [10, 11], de la protéine du virus de la mosaïque du tabac [12, 13], du lysozyme [14] et de l'hémoglobine humaine [15, 16]. Parmi ces protéines étudiées, aucune n'a un poids moléculaire supérieur à 17.000. Car, dès qu'il s'agit de protéines plus complexes, l'application des seules méthodes enzymatiques rend l'établissement de la structure chimique extrêmement laborieux, étant donné que l'action des différentes endopeptidases fournit toujours un très grand nombre de séquences, ce qui rend pratiquement impossible la détermination de leur enchaînement complet au sein de la molécule.

La préparation reproductible de fragments relativement importants de chaînes de protéines revêt donc une importance considérable comme première étape pour la détermination de la structure primaire.

Dans ce but, on a proposé, depuis 1953 [17], de changer les conditions (pH, température, durée) de l'hydrolyse enzymatique, en vue d'obtenir des produits de dégradation plus longs. Ceci constitue, toutefois, une méthode difficilement reproductible et peu spécifique.

Il est possible d'obtenir des séquences prolongées (constituées par exemple de plusieurs unités tryptiques ou chymotryptiques) en modifiant de façon spécifique certains groupements libres de la protéine.

La modification chimique des protéines est couramment utilisée pour l'étude de leur activité biologique, pour la préparation de dérivés modifiés dans le but de les rendre plus aptes à un usage médical ou industriel ou pour la préparation de dérivés soumis à des investigations immunologiques [18]. Mais, depuis l'introduction de la méthode de SANGER [19], la modification chimique a pris également un intérêt toujours croissant pour l'analyse de la structure des protéines [20, 21, 22].

Parmi les enzymes protéolytiques disponibles, la trypsine a certes, la plus grande spécificité. Puisqu'elle ne scinde que les liaisons peptidiques impliquant le groupement carboxylique des résidus d'arginine et de la lysine, il est compréhensible que la modification chimique, dans le but d'une étude structurale ultérieure, doit viser, de préférence, un de ces deux acides aminés.

Le groupement ϵ -aminé de la lysine réagit facilement avec divers agents chimiques, ce qui doit permettre la préparation reproductible de séquences relativement importantes, l'activité de la trypsine étant inhibée au niveau des résidus de lysine modifiée, par empêchement stérique [23]. De cette façon, la trypsine ne coupera plus la chaîne polypeptidique qu'au niveau des groupements carboxyliques des résidus d'arginine. La désamination [24], la guanidination [25, 26] et l'acétylation [27] sont les modifications chimiques les plus couramment utilisées pour le groupement ϵ -aminé de la lysine. D'autre part, LI et al. [28] ont traité avec succès l'adrénocorticotropine par l'anhydride succinique et ont obtenu une succinylation complète des groupements aminés libres. Ils ont constaté, en outre, que l'action de la trypsine était inhibée au niveau des résidus succinylés. Le même réactif a également été utilisé par HABEEB et al. [29] au cours de l'étude des modifications chimiques d'antigènes protéiques et de leurs anticorps spécifiques.

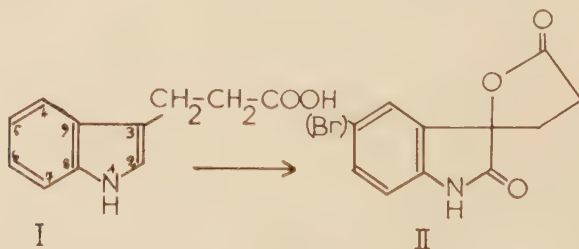
Après blocage des groupes ϵ -aminés de la lysine par dinitrophénylation [21] ou par carbobenzoxylation [20], les résultats obtenus sont peu satisfaisants : de nombreuses difficultés techniques apparaissent au cours de l'expérimentation (blocage incomplet des groupes ϵ -aminés qui ne sont pas tous « accessibles » aux réactifs, ralentissement net de l'action de la trypsine par suite de la diminution de la solubilité du substrat, difficulté de régénération des peptides après la carbobenzoxylation, insolubilité des DNP-peptides formés, etc.). HOLLEMAN et BIZERTE [22] et WEIL et TELKA [30], par contre, ont obtenu des résultats intéressants par hydrolyse tryptique de la myoglobine de cheval acétylée et de l' α -lactalbumine acétylée ou guanidinée. De même, la transformation du groupement ϵ -aminé de la lysine en un dérivé dithiocarbamylique, par action du disulfure de carbone [31], semble constituer une technique valable pour n'obtenir que des coupures au niveau des résidus d'arginine, après hydrolyse tryptique.

Avant l'emploi des enzymes protéolytiques pour la dégradation spécifique des protéines, les chercheurs ont déjà abordé le vaste problème de l'hydrolyse spécifique de certaines liaisons peptidiques. On avait observé que les bases et acides, utilisés depuis longtemps pour la dégradation des protéines, montrent une faible spécificité uniquement dans le cas où des groupements fonctionnels labilisent la liaison peptidique adjacente. Ainsi DESNUELLE et al. [32, 33] ont pu démontrer que les hydroxyles de la thréonine et de la sérine participent à des hydrolyses acides en les facilitant. Ces travaux ont également été poursuivis par d'autres chercheurs qui ont eu des résultats satisfaisants avec différents réactifs tels que l'acide phosphorique anhydre [34] et l'acide sulfurique concentré [35].

Le brome en milieu aqueux a été utilisé au cours des travaux de DU VIGNEAUD et al. [36, 37, 38, 39] sur la structure de l'ocytocine et de la vasopressine. Ils ont établi qu'un tel traitement provoque la scission spécifique de ces polypeptides au niveau des groupements carboxyliques des résidus de tyrosine. Le même phénomène a été constaté par THOMPSON sur l'insuline [40]. Ce sont finalement COREY et al. [41] qui ont démontré qu'il s'agit là d'un procédé d'oxydation, au cours duquel le noyau phénolique est transformé en un système de diénones, et non d'une simple hydrolyse. LAWSON et al. [42] ont signalé l'emploi du bromure de cyanogène pour la coupure spécifique des liaisons peptidiques impliquant le groupement carboxylique du résidu de méthionine et ont obtenu des résultats satisfaisants dans le cas de la ribonucléase.

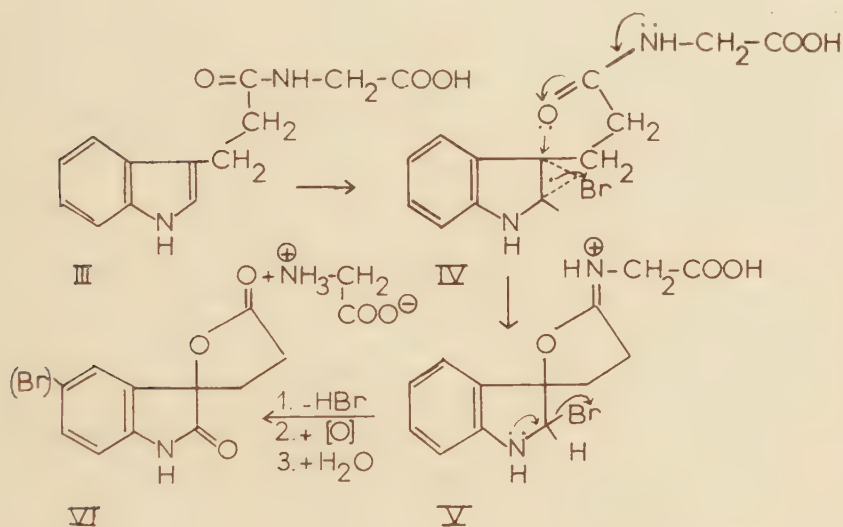
Le fait que les protéines réagissent avec des agents de bromination et les acides aminés avec le N-bromosuccinimide (NBS) a permis d'utiliser ce dernier pour la décarboxylation des acides aminés et pour l'analyse des groupements carboxyliques C-terminaux des peptides et des protéines [43]. SCHMIR, COHEN et WITKOP [44] ont étudié sur des substrats synthétiques l'emploi du NBS comme agent chimique coupant spécifiquement la chaîne polypeptidique au niveau des résidus de tyrosine. PATCHORNIK, LAWSON et WITKOP [45, 46] ont proposé le NBS comme agent hydrolysant spécifique des liaisons peptidiques impliquant le groupement carboxylique du résidu de tryptophane.

La capacité des liaisons peptidiques de participer à la réaction de lactonisation a été démontrée avec la N-carbobenzoyloxy-L-tryptophylglycine. Cette rupture de la liaison peptidique, sous l'influence du NBS, semble suivre un mécanisme analogue à celui proposé pour la formation de la bromolactone (II) à partir de l'acide indole-3-propionique (I).



Dans le cas d'un peptide tel que l'indole-3-propionylglycine (III), l'interaction du groupement carbonylamide avec la position 3 de l'intermédiaire hypothétique (IV) provoque la formation du sel d'une imino-lactone (V) qui, après oxydation ultérieure par une deuxième

molécule de NBS d'une indolénine intermédiaire et l'hydrolyse de l'iminolactone instable, donne la lactone et la glycine libre (VI). Cette bromination de la lactone (VI) a lieu facilement et les composés portant un brome en position 5 ont été isolés avec un très bon rendement.



Appliqué au glucagon [46, 47] qui contient 29 acides aminés dont un résidu de tryptophane, la coupure par le NBS a permis d'obtenir le térapeptide C-terminal, précédé par l'unique résidu de tryptophane. Ce résultat a servi de démonstration pour l'utilité de la méthode. L'emploi du NBS a ensuite été étendu aux protéines plus complexes [48], telles que la protéine du virus de la mosaïque du tabac, la sérumalbumine de bœuf et la sérumalbumine humaine. Toutes ces protéines ne renferment qu'un ou deux résidus de tryptophane dans leur molécule et les résultats obtenus ont été satisfaisants. Après action du NBS et réaction des nouveaux résidus N-terminaux apparus avec le fluorodinitrobenzène, les auteurs ont pu conclure que la coupure au niveau d'un résidu de tryptophane se faisait régulièrement, avec un rendement variant entre 20 et 40 % pour chaque liaison rompue.

Avec le lysozyme, par contre, protéine riche en tryptophane (6 résidus) [14], la méthode semblait moins efficace pour la rupture des liaisons impliquant les résidus de tryptophane. Dans les conditions utilisées par les auteurs : 1) les nouveaux résidus N-terminaux apparus variaient qualitativement et quantitativement, et 2) les rende-

ments étaient très faibles pour la plupart d'entre eux. Ces observations ont également été confirmées par PETERS [49]. De même la créatine-phosphokinase [50], qui renferme 11 à 12 résidus de tryptophane, semble, elle aussi, résister à l'action du NBS, dans les conditions expérimentales utilisées, et seul un résidu DNP-Val apparaît après traitement de l'enzyme par 100 moles de NBS/mole de protéine, suivi d'une dinitrophénylation.

Des travaux intéressants sont actuellement en cours pour étudier l'application du NBS comme agent spécifique pour la coupure de la chaîne polypeptidique après les résidus de phénylalanine, d'histidine et de cystéine [51, 52]. Une excellente revue d'ensemble des méthodes chimiques utilisées pour la coupure spécifique des protéines a récemment été publiée par WITKOP [53].

Dans la première partie de ce travail, notre but était de démontrer qu'au niveau d'un résidu de lysine modifiée, la chaîne peptidique ne pouvait plus être scindée par la trypsine.

En choisissant l'acétylation pour notre étude, nous avons été guidés par les raisonnements suivants :

1° Il est généralement admis que l'acétylation des protéines par l'anhydride acétique constitue une méthode spécifique pour modifier les groupements aminés libres.

2° Les résidus de lysine ainsi modifiée (résistant aux différents agents d'hydrolyse) peuvent être aisément chromatographiés sur colonne d'échangeurs d'ions, ce qui facilite considérablement l'étude ultérieure des séquences impliquant la lysine modifiée.

3° Depuis le travail de WONG et LIENER [54], nous possédons une méthode permettant l'acétylation complète d'une protéine.

Il nous a semblé intéressant d'utiliser le lysozyme de blanc d'œuf de poule pour ces investigations, plutôt qu'une autre protéine de structure chimique parfaitement connue (comme par exemple la ribonucléase) car, d'une part, l'étude de la composition chimique du lysozyme a rencontré maintes difficultés, du fait surtout de la présence de nombreux résidus de tryptophane et de cystine dans sa molécule [55], d'autre part, l'établissement de toutes les « unités tryptiques » par JOLLÈS et al. [56], suivi d'une formule complète de l'enchaînement de tous les acides aminés du lysozyme [14], devait nous permettre de vérifier rapidement la validité de notre méthode. De ce fait, les cinq « unités tryptiques » comportant un ou deux résidus de lysine (on sait que le lysozyme contient l'enchaînement Lys-Lys) devaient être retrouvées sous forme de séquences, prolongées à partir du résidu de lysine modifiée par un enchaînement dont

l'acide aminé C-terminal est constitué par l'arginine. En outre, nous devons retrouver les unités tryptiques ne comportant qu'un résidu d'arginine. Les résultats expérimentaux ont permis de démontrer la validité de cette méthode pour l'étude de la structure chimique des protéines.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons essayé de déterminer les conditions de réaction optimales du NBS avec le lysozyme. Nous avons, ensuite, étudié qualitativement et quantitativement les nouveaux résidus N-terminaux apparus, en faisant appel à la technique de SANGER. Enfin, nous avons essayé de séparer dans différentes conditions les peptides formés après action du NBS sur le lysozyme. Nous avons également étudié la modification des spectres ultraviolets du lysozyme après action du NBS et la répercussion de ce traitement sur l'activité lysante de la protéine.

Dans une troisième partie, nous avons appliqué la méthode du NBS à la caséine kappa, glycoprotéine d'un poids moléculaire de près de 30.000, dont l'étude de la structure primaire est encore à ses débuts. On connaît sa composition en acides aminés et on a déterminé qu'elle doit contenir deux résidus de tryptophane. Après action du NBS sur la protéine, nous avons pu mettre en évidence l'apparition de deux nouveaux résidus N-terminaux avec un rendement satisfaisant, ce qui a permis de vérifier sur une autre protéine la validité de cette méthode pour la détermination des enchaînements Try-acide aminé à l'intérieur d'une molécule de protéine.

Nous avons également essayé de caractériser les produits de dégradation du tryptophane par leurs spectres ultraviolets et par leurs R_f au cours de chromatographies sur papier.

En conclusion, nous dirons quelques mots sur la validité de ces méthodes pour l'étude de la structure chimique des protéines.

METHODES

CHAPITRE I

PREPARATION DES DIVERS DERIVES MODIFIES

Pour nos expériences de modifications chimiques, nous avons choisi le lysozyme de blanc d'œuf de poule, protéine étudiée depuis de nombreuses années dans ce laboratoire.

Toutes les modifications chimiques visaient les groupements ϵ -aminés libres de la protéine, c'est-à-dire les résidus de la lysine. En utilisant la trypsine, endopeptidase avec une haute spécificité, ne scindant que les liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques des résidus de lysine et d'arginine, nous escomptions que l'empêchement stérique inhiberait la scission enzymatique par la trypsine au niveau d'un résidu de lysine modifiée.

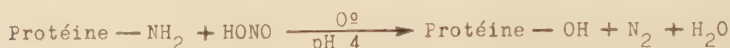
Puisque les dérivés du lysozyme devaient être soumis à une hydrolyse tryptique et ultérieurement chromatographiés sur colonne de résine échangeuse d'ions, afin d'en étudier les « unités tryptiques », nous avons toujours travaillé sur le lysozyme réduit et traité par l'acide iodacétique, dont nous décrirons la préparation plus loin. Il est utile, en outre, de rappeler que le lysozyme natif n'est pas attaqué par la trypsine [57]. Ceci est dû à sa structure secondaire stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaires et des ponts disulfures. Il suffit d'une dénaturation par la chaleur, qui scinde les liaisons hydrogènes, pour rendre le lysozyme sensible à l'action de la trypsine. Les ponts disulfures sont rompus par des agents de réduction ou d'oxydation.

I. — DESAMINATION

La désamination par l'acide nitreux est à la base de la méthode bien connue de Van Slyke pour la détermination des groupements aminés. Cette réaction, appliquée soigneusement, a été longtemps considérée comme la meilleure méthode pour mesurer les groupements aminés libres des protéines. La réaction est rapide et quantitative et a trouvé une large application pour estimer le degré de substitu-

tion des groupements aminés dans les protéines chimiquement modifiées. Plus récemment, c'est la méthode à la ninhydrine qui est entrée en faveur [58].

Nous avons choisi le procédé de désamination décrit par PHILPOT et SMALL [24, 18] :



120 mg de lysozyme réduit sont dissous dans 10 ml d'une solution 0,5 M en acétate de Na et 1,0 M en nitrite de Na. Le pH est amené à 3,8 par addition d'acide chlorhydrique N. On laisse ensuite reposer la solution pendant 30 minutes à 0°. Après ce temps, elle est neutralisée par addition de soude 2,5 N afin d'arrêter la réaction. La solution est finalement dialysée, contre de l'eau distillée à 4°, pendant un temps prolongé, pour éliminer l'excès de nitrite. Après lyophilisation, on obtient un matériau couleur ivoire.

II. — GUANIDINATION

Nous avons choisi pour la guanidination le procédé décrit récemment par HABEED [25, 26] utilisant comme réactif le nitrate de 3,5-diméthyl-1-guanylpirazole ; il permet la guanidination des protéines à des pH sensiblement plus bas que, par exemple, l'o-méthylisourée, considéré jusqu'à présent comme réactif de choix pour la guanidination des groupes aminés libres [59]. Ce nouveau réactif a déjà été utilisé par SCOTT et al. [60] et BANNARD et al. [61] pour la préparation de mono- et dialkylguanidines à partir d'amines aliphatiques et aromatiques.

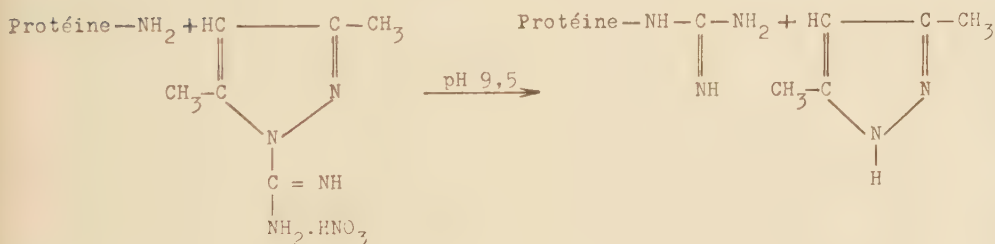
1) *Préparation du nitrate d'aminoguanidine*

A 1 g de bicarbonate d'aminoguanidine sont ajoutés, goutte à goutte, 9 ml d'acide nitrique à 10 %. Le bicarbonate d'aminoguanidine, insoluble dans l'eau, se solubilise au fur et à mesure que l'on ajoute la solution d'acide nitrique. Après addition des 9 ml d'acide nitrique, le pH, jusqu'alors aux environs de 5, vire à pH 1-2. On ajoute ensuite encore un excès d'acide nitrique, ce qui amène une dissolution complète du bicarbonate d'aminoguanidine. Cette solution reste une nuit à la glacière et, le lendemain, on observe une formation de cristaux au fond du récipient. Ce produit brut est deux fois recristallisé par l'alcool à chaud. La détermination du point de fusion ($F = 144^\circ$) permet de caractériser le nitrate d'aminoguanidine formé.

2) Préparation du nitrate de 3, 5-diméthyl-1-guanylpypyrazole

Une quantité équimoléculaire d'acétylacétone est ajoutée à 500 mg de nitrate d'aminoguanidine. Après addition de 5 ml d'alcool éthylique à 25 %, la solution est mise dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant. Le ballon est chauffé, pendant trois heures, au bain-marie bouillant. Lorsque l'on retire le ballon, 5 ml d'alcool éthylique à 95 % sont encore ajoutés à la solution qui doit rester environ 20 heures à 0°. La solution est finalement évaporée. Il reste des cristaux au fond du récipient qui sont deux fois recristallisés par l'alcool à chaud et caractérisés par la détermination de leur point de fusion, F = 168° (ils fondent en moussant).

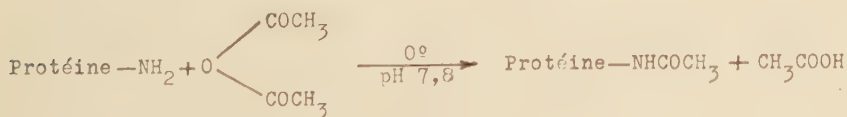
3) Guanidination de la protéine



40 mg de nitrate de 3,5-diméthyl-1-guanylpypyrazole sont dissous dans 2 ml d'eau. Le pH de la solution est amené à 9,5 par addition de soude N. Le volume de la solution est ensuite amené à 4 ml, par addition d'eau distillée, afin d'obtenir une molarité de 0,05. On y ajoute 10 mg de protéine. Durée de la réaction : 3 jours à 0°. La solution est finalement dialysée, pendant deux jours, contre de l'eau distillée à 4°, et ensuite lyophilisée. On obtient une poudre blanche.

III. — ACÉTYLATION

L'acétylation a été obtenue en utilisant le procédé de Hughes repris par FRAENKEL-CONRAT [27].



500 mg de protéine sont dissous dans 10 ml d'une solution d'acétate de Na demi-saturée, à 0°, dans un bain de glace. Le mélange réactionnel est porté sur un agitateur magnétique. On y ajoute, pendant 90 minutes, 0,6 ml d'anhydride acétique, en fractions de 0,1 ml tous les quarts d'heure. Le mélange réactionnel reste encore une heure sur l'agitateur magnétique et une heure et demie à la glacière. Il est ensuite mis à dialyser, pendant 20 heures, contre de l'eau distillée, à 4°. Après lyophilisation, on obtient une poudre blanche.

Afin d'obtenir une acétylation complète de la protéine, nous avons fait appel à la méthode décrite par WONG et LIENER [54]. La première acétylation se fait exactement dans les mêmes conditions que celle décrite ci-dessus. Mais, après une dialyse de vingt heures contre de l'eau, on fait une deuxième acétylation, analogue à la première, en ajoutant préalablement une quantité suffisante d'acétate de Na au dialysat pour obtenir une solution demi-saturée. Le mélange réactionnel est encore une fois dialysé contre de l'eau, pendant vingt heures, et ensuite lyophilisé. On obtient une poudre blanche.

IV. — REDUCTION DES PONTS DISULFURES

La réduction d'une protéine par l'acide thioglycolique, suivie par un traitement par l'acide iodacétique, permet de garder intacts les résidus de tryptophane et de rendre aptes à la chromatographie les résidus de cystine, dont chacun donne naissance à deux résidus de S-carboxyméthylcystéine.

Nous décrirons ici les conditions requises pour le lysozyme [62] : 1,650 g de lysozyme sont dissous dans 100 ml d'urée 8 M. La solution est amenée à pH 8 par addition de triméthylamine à 25 % (V_1). On ajoute ensuite 2,8 ml d'acide thioglycolique et on amène de nouveau le pH à 8 par addition de NH_4OH concentré (V_2). Une quantité d'urée 8 M, correspondant aux volumes $V_1 + V_2 + 2,8$ est finalement ajoutée à la solution, que l'on laisse ensuite reposer pendant 5 heures à la température ambiante. Après ce temps, on y ajoute 13 g d'acide iodacétique et le pH est ramené à 8,2 avec de l'ammoniac concentré. Cette préparation est ensuite additionnée par 10 fois son volume du mélange acétone : HCl N (39 : 1, v/v) et laissée une nuit à la glacière. Le lendemain, le précipité blanc qui s'est formé est lavé deux fois avec le mélange acétone : HCl N et ensuite deux fois par l'éther éthylique. La poudre ainsi purifiée est séchée sous vide. Ensuite, on la met en suspension dans 120 ml d'eau et l'on

dialyse pendant 48 heures contre de l'eau distillée à 4°. Pour finir, la préparation est lyophilisée. Le rendement de cette opération est de l'ordre de 80 %.

V. — OXYDATION PAR L'ACIDE PERFORMIQUE

L'oxydation par l'acide performique [63] transforme chaque résidu de cystine en deux résidus d'acide cystéique et rend les peptides contenant ce nouvel acide aminé aptes à être chromatographiés.

200 mg de lysozyme sont dissous dans 2 ml du mélange oxydant composé d'une partie d'eau oxygénée à 110 volumes et 9 parties d'acide formique concentré, mélange préparé une heure avant emploi. La solution est homogénéisée et laissée ensuite 45 minutes à — 15°, dans un mélange de glace et de sel. Au bout de ce temps, on y ajoute 6 ml d'eau, homogénéise à nouveau et on amène la préparation à sec. Le produit est encore repris deux fois par 2 ml d'eau et chaque fois il est amené à sec au dessiccateur.

CHAPITRE II

ETUDE GENERALE ET COMPARATIVE DES DIVERS DERIVES MODIFIES

I. — SPECTRES ULTRAVIOLETS

Les protéines possèdent, en général, un spectre caractéristique dans l'ultraviolet, grâce à la présence de certains acides aminés tels que tryptophane, tyrosine et phénylalanine dans leur molécule. Ce fait peut être utilisé pour vérifier l'intégrité de la molécule après les différents traitements chimiques. En même temps, ceci permet d'apprécier la teneur en sels des divers dérivés modifiés obtenus, car une même quantité de protéine donne toujours les mêmes maxima d'absorption.

Les mesures sont faites avec un spectrophotomètre Beckman, modèle « DU ». 0,4 à 1 mg de protéine sont dissous dans 3 ml de soude 0,1 N ou d'acide chlorhydrique 0,1 N. Le spectre est déterminé entre 240 et 310 $m\mu$.

II. — ETUDE DE LA VALEUR DE L'AZOTE AMINE PAR DOSAGE A LA NINHYDRINE

La ninhydrine permet de doser les groupements aminés libres [58].

Au cours de toutes les modifications chimiques que nous avons fait subir à la protéine, ce sont toujours les groupements ϵ -aminés de la lysine et le groupement α -aminé de la lysine N-terminale du lysozyme qui sont remplacés par d'autres résidus. Par un dosage à la ninhydrine nous avons la possibilité d'évaluer le nombre des groupements aminés libres ou masqués d'une protéine. La valeur obtenue par la détermination de l'azote aminé du lysozyme non modifié correspond théoriquement aux 18 groupes aminés libres, tous acces-

sibles aux divers agents chimiques dans le cas du lysozyme réduit. Par simple calcul, il est possible de se rendre compte de la baisse ou de l'augmentation du nombre des groupements aminés libres de la protéine.

• DESCRIPTION D'UNE EXPÉRIENCE TYPE :

Dix mg de lysozyme natif et 10 mg de lysozyme modifié sont dissous dans 1 ml d'une solution de tampon phosphates à pH 7,8 ; 0,2 M. 0,1 ml de chaque solution de lysozyme sont prélevés (en double) et amenés à 1 ml par addition de 0,9 ml d'eau. On y ajoute ensuite le réactif à la ninhydrine (1 ml).

Préparation du réactif à la ninhydrine : pour le dosage d'un échantillon il faut :

- 20 mg de ninhydrine ;
- 3 mg d'hydrindantine ;
- 0,75 ml de méthylcellosolve ;
- 0,25 ml d'une solution de tampon acétate de Na, pH 5,5, 4 M.

Les tubes, additionnés du réactif à la ninhydrine, sont chauffés au bain-marie bouillant pendant 15 minutes. Ils sont ensuite refroidis, et à chaque tube, sont ajoutés 5 ml d'alcool éthylique à 50 %. La coloration est lue, au photomètre Coleman, à 570 m μ .

III. — ETUDE DU COMPORTEMENT DES DERIVES MODIFIES AU COURS DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE

Le comportement des différents dérivés modifiés au cours de l'hydrolyse trypsique doit nous indiquer si le nombre des coupures a effectivement diminué, c'est-à-dire si la modification du groupement ϵ -aminé de la lysine constitue un obstacle qui empêche la trypsine de couper la liaison peptidique impliquant le résidu carboxylique de la lysine.

L'hydrolyse trypsique est faite à 37° et à pH 7,8. La concentration en substrat est fixée à 1 %. Le rapport enzyme/substrat est de 1/50° à 1/100°. Pour suivre le cours de l'hydrolyse trypsique, des fractions aliquotes sont prélevées au bout de 10, 30 et 50 minutes, 2, 5, 8 et 24 heures et analysées par le réactif à la ninhydrine. Les résultats sont exprimés dans un graphique où les temps de prélèvement sont portés en abscisse et la valeur de l'azote aminé en ordonnée. Comparées aux chiffres obtenus avec une protéine native (pratiquement non attaquée par la trypsine) et une protéine réduite ou déna-

turée par la chaleur (nombre de coupures maximum), les courbes obtenues permettent d'évaluer le pourcentage d'inhibition pour chaque dérivé modifié.

IV. — DETERMINATION DES GROUPEMENTS ACETYLES

La méthode décrite par LUDOWIEG et DORFMAN [64] utilise les réactifs suivants :

- a) NH_2OH , HCl 0,35 M ;
- b) NaOH 1,5 N ;
- c) NH_2OH alcalin ; cette solution est préparée juste avant emploi, en mélangeant des volumes égaux d'hydroxylamine- HCl 0,35 M et de NaOH 1,5 N ;
- d) acide perchlorique 0,75 M ;
- e) solution d'acide ferriperchlorique, préparée en dissolvant 1,9 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ dans 5 ml de HCl concentré. A cette solution on ajoute 5 ml d'acide perchorique à 70 %. La solution est amenée à sec et diluée à 100 ml par l'eau. L'acidité de cette solution est entre 0,55 et 0,65 M.

Il faut souligner ici que cette méthode dose aussi bien les groupements N- que O-acétyles.

• PRINCIPE DE LA MÉTHODE :

La désacétylation des composés N-acétylés par le mélange méthanol : HCl 2 N transforme les groupes acétyles en méthylacétate, qui est colorimétriquement déterminé sous forme d'un complexe hydroxamique-ferrique. Le réactif pour la désacétylation est préparé en absorbant du HCl sec dans du méthanol absolu réfrigéré. Une quantité aliquote de la solution HCl : alcool est titrée avec un standard d'alcali et une solution 2 N est préparée par dilution.

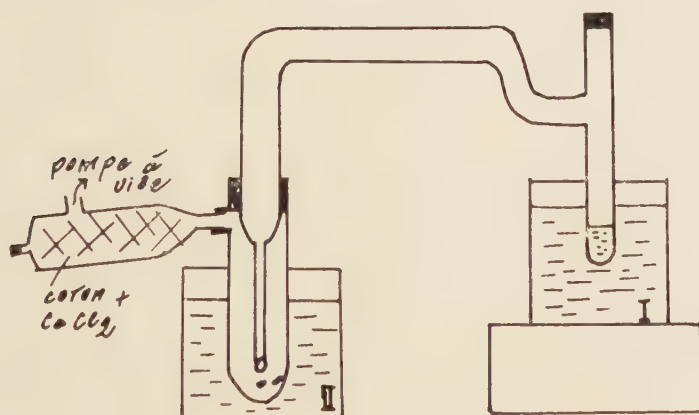
• PROCÉDÉ :

Une quantité du composé à analyser, correspondant à 1-10 μM de N-acétyl-glucosamine, est placée dans un tube en Pyrex de 70×7 mm. S'il s'agit d'une solution, celle-ci est évaporée à sec, dans un dessiccateur, en présence de CaCl_2 anhydre. Au résidu sec on ajoute 0,5 ml d'une solution méthanol : HCl 2 N. Cette solution de méthanol acide est refroidie, pendant quelques secondes, en présence d'un mélange de carboglace-méthanol, et le tube est rapidement scellé. Le tube

est chauffé pendant 4 heures dans un bain-marie à 100°, refroidi et ouvert. En même temps, on a préparé une gamme-témoin avec de la N-acétylglucosamine, qui est traitée de la même manière que l'échantillon à analyser.

- DISTILLATION :

Schéma de l'appareil utilisé pour la distillation :



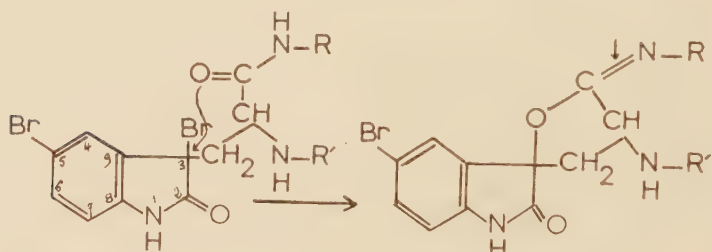
Le contenu du tube à analyser est soigneusement placé dans le fond de la chambre I qui trempe dans un bain-marie maintenu à la température de 35 à 45°. La chambre II destinée à recevoir le distillat, est refroidie par un mélange d'acétone-carboglace. Quand tout le distillat a été recueilli dans la chambre II, on ajoute dans la chambre I 0,5 ml de méthanol à 50 % et la distillation est reprise. Cette deuxième opération sert à rincer la chambre I à fond.

- DÉTERMINATION DU MÉTHYLACÉTATE :

Après distillation complète, la chambre II est enlevée et placée dans un bain-marie à 20-25°. Après 2 minutes, 1 ml d'eau est ajouté, suivi par 2 ml d'une solution d'hydroxylamine alcaline. Le tube est agité, puis on le laisse reposer pendant 10 minutes. 2 ml d'acide perchlorique 0,75 M sont ajoutés, le mélange est agité et 1 ml d'une solution d'acide ferriperchlorique est ajouté. La coloration est lue, après 5-10 minutes, à 520 m μ au photomètre Coleman. La quantité de méthylacétate est estimée en comparant les chiffres obtenus avec la gamme-témoin.

ETUDE DE L'ACTION DU N-BROMOSUCCINIMIDE SUR LES PROTEINES

PATCHORNIK, LAWSON et WITKOP [45, 46] ont rapporté qu'un traitement par le N-bromosuccinimide (NBS) peut couper spécifiquement les chaînes polypeptiques, au niveau des résidus de tryptophane. Ils proposent que la réaction provoque l'oxydation au niveau de la double liaison 2-3, avec introduction de brome sur le carbone 3, et oxydation du carbone 2. Un atome de brome est également introduit sur le carbone 5. Il se forme alors spontanément une iminolactone entre le carbone 3 et le groupe carboxyle.



Ensuite, la liaison imino est rompue, coupant la chaîne peptidique et créant un nouveau groupe α -aminé libre.

I. — METHODES UTILISEES POUR LA MISE AU POINT DES CONDITIONS OPTIMALES POUR LA REACTION

Pour trouver les conditions optimales de réaction entre le lysozyme et le NBS nous avons procédé à des essais, faisant varier soit le milieu réactionnel, soit le nombre de moles de NBS par mole de

lysozyme ou de tryptophane. Seule la concentration en lysozyme ne variait pas et restait dans toutes les expériences de 10 mg/ml de milieu réactionnel. Les milieux réactionnels testés ont été les suivants : acide acétique à 50, 60, 70 et 80 %, tampon acétate pH 4. Sachant que la molécule de lysozyme contient 6 résidus de tryptophane (14), nous avons fait réagir dans tous les essais 2, 4, 6 et 8 moles de NBS par mole de tryptophane.

• DESCRIPTION D'UNE EXPÉRIENCE-TYPE :

Calcul préliminaire :

— 1 mole de lysozyme = 14.000 g ;

— 1 mole de NBS = 178 g ;

d'où pour 10 mg de lysozyme on utilise 127 μ g de NBS.

Si l'on veut faire réagir 1 mole de NBS par mole de tryptophane dans le lysozyme, il faut multiplier 127×6 .

5×10 mg de lysozyme sont dissous dans 0,5 ml d'acide acétique à 60 %, dans 5 tubes à hémolyse. Des quantités de NBS correspondant à 2,4, 6 et 8 moles de NBS par mole de tryptophane dans la protéine sont dissous séparément dans 5 ml d'acide acétique à 60 %. On ajoute maintenant 0,5 ml de ces différentes solutions de NBS à 4 solutions de lysozyme. La cinquième fraction de lysozyme est amenée à 1 ml par addition d'acide acétique à 60 % et servira de solution-témoin.

L'augmentation de l'azote aminé, due à l'apparition de nouveaux groupes N-terminaux après action du NBS, est évaluée par dosage à la ninhydrine et les valeurs obtenues sont comparées à celles de la solution-témoin.

II. — MISE EN EVIDENCE
DES NOUVEAUX GROUPES N-TERMINAUX
FORMES APRES ACTION DU NBS

Les nouveaux groupes N-terminaux apparus ont été caractérisés par la méthode de SANGER [19].

100 mg de lysozyme traités par 6 moles de NBS par mole de tryptophane, en présence d'acide acétique à 60 %, sont amenés à sec. Le résidu est repris par 10 ml d'eau et le pH est amené à 8 par addition de triméthylamine à 25 %. On ajoute ensuite 50 mg de fluorodinitrobenzène (FDNB), dissous dans 2 ml d'alcool éthylique à 95 %, en réajustant le pH, si nécessaire. La préparation est placée sur un agitateur magnétique, à l'abri de la lumière, et y restera

pendant 4 heures à la température ordinaire. Il est important de vérifier fréquemment si le pH n'a pas varié. Après 4 heures, on obtient un précipité et une phase liquide.

• TRAITEMENT DU PRÉCIPITÉ :

Le précipité est lavé plusieurs fois à l'éther, afin d'éliminer l'excès de FDNB.

• TRAITEMENT DE LA PHASE LIQUIDE :

Là aussi, on commence par une extraction à l'éther pour éliminer l'excès de FDNB, en maintenant constamment le pH à 8. Lorsque toute trace de FDNB a été éliminée, on acidifie la phase liquide par addition d'acide chlorhydrique 4 N et on extrait 5 fois avec l'acétate d'éthyle. Ces deux solutions sont amenées à sec, sous vide, dans un dessiccateur sur acide sulfurique concentré.

Afin de déterminer laquelle des trois préparations (précipité, phase aqueuse ou phase d'acétate d'éthyle) contient les DNP-aminoacides,

TABLEAU I

*Composition des différents solvants utilisés
au cours de la chromatographie sur papier des DNP-aminoacides*

DNP-aminoacides acidosolubles :	<i>Solvant A</i> : n-butanol : acide formique : eau (75 : 15 : 10, v/v)
DNP-aminoacides éthérosolubles :	<i>Solvant B</i> : phénol : alcool isoamylique : eau (100 : 100 : 100, v/v)
	<i>Solvant C</i> : tampon citrate, pH 6,2 (105 g d'acide citrique + 56,5 g de NaOH pour 500 ml)
	<i>Solvant D (1)</i> : premier solvant : alcool amylique : tampon phtalate pH 6 (v/v)
	<i>Solvant D (2)</i> : deuxième solvant : sulfate de Na 1,5 M : tampon phtalate pH 6 ; 0,05 M *

* On obtient le tampon phtalate pH 6 ; 0,05 M en ajoutant 50 ml de phtalate acide de K 0,1 M à 45,45 ml de NaOH 0,1 N et en ajustant finalement le mélange à 100 ml par de l'eau exempte de CO₂.

provenant des nouveaux résidus N-terminaux formés après action du NBS sur le lysozyme, des fractions aliquotes de chaque préparation sont hydrolysées (HCl 10, 7 N ; 110° ; 2 ou 8 heures) dans des tubes scellés. Chaque hydrolysat est ensuite dilué 5 fois par l'eau, de

façon a amener la concentration en HCl à 2-3 N. On extrait alors les hydrolysats 5 fois par l'éther, pour obtenir ainsi 3 fractions éthérosolubles et 3 fractions acidosolubles, qui sont amenées à sec.

Pour séparer les DNP-aminoacides des différentes fractions nous avons utilisé la chromatographie sur papier, dans plusieurs solvants, dont nous indiquons la composition dans le *tableau I*.

Les fractions acidosolubles sont reprises par l'eau et chromatographiées sur papier Whatman n° 1, dans le solvant A, avec des points témoins : ϵ -DNP-lysine et DNP-arginine, qui se distinguent par leurs R_f différents. En outre, il est possible de caractériser la DNP-arginine par le réactif de Sakaguchi [65].

Les fractions éthérosolubles sont reprises par l'alcool à 95 % et chromatographiées dans le solvant B [66], sur papier Schleicher et Schüll 507, en présence des DNP-aminoacides suivants : DNP-glycine, DNP-sérine, DNP-acide aspartique, DNP-leucine, DNP-alanine, DNP-valine et di-DNP-lysine. Dans ce solvant, il est impossible de séparer la DNP-sérine du fluorodinitrobenzène et la DNP-leucine de la DNP-phénylalamine. Leur séparation est possible dans le solvant de ROVERY [67] (Solvant C).

Nous avons encore utilisé une troisième méthode de chromatographie sur papier, qui permet la séparation de tous les DNP-aminoacides. Elle fait appel à une chromatographie bidimensionnelle et a été décrite par PAIRENT et WILLIAMSON [68]. La première séparation se fait par chromatographie dans le solvant D (1), pendant 20 heures. On utilise le papier Whatman n° 1, préalablement tamponné par le tampon phtalate pH 6 ; 0,05 M. Après la première chromatographie, la feuille est séchée à l'air libre, pendant 2 à 3 heures ; on fait ensuite la deuxième chromatographie dans le solvant D (2), pendant environ 20 heures.

Dans tous les cas, l'appréciation de la quantité de chaque DNP-aminoacide se fait par lecture au spectrophomètre Beckman, modèle « DU », à 360 m μ en présence de 3 ml de bicarbonate de Na à 1 %, après élution des taches soit par un mélange acétone : HCl N (v/v), soit en plaçant les taches découpées dans des tubes à hémolyse contenant 3 ml de bicarbonate de Na à 1 %. Ces tubes sont chauffés pendant 20 minutes à 50-55°, dans un bain-marie, ensuite agités et centrifugés.

Les valeurs obtenues par lecture à 360 m μ sont transformées en μ g de DNP-aminoacides, à l'aide d'une gamme de DNP-alanine, où des quantités connues sont mesurées à 360 m μ .

Si, dans certains cas, il n'est pas possible de déterminer indiscutablement l'identité d'un DNP-aminoacide par les différentes méthodes

de séparation comme c'est généralement le cas pour le couple DNP-leucine-DNP-isoleucine, on peut régénérer le DNP-aminoacide et déterminer ensuite sa nature par les méthodes classiques d'analyse des acides aminés.

• MODE DE RÉGÉNÉRATION :

Ajouter quelques gouttes de HCl 10 N aux DNP-aminoacides se trouvant à l'état sec dans un tube à hémolyse. Sceller le tube après y avoir fait le vide. Hydrolyser pendant 20 heures à 110°. Le tube est ensuite ouvert et l'acide chlorhydrique en est chassé par évaporation sous vide. Le ou les acides aminés régénérés sont alors repris par l'eau et chromatographiés sur papier dans le solvant que l'on choisit suivant l'acide aminé escompté.

III. — MESURE DE L'ACTIVITE LYSANTE DU LYSOZYME

Il nous a semblé intéressant de déterminer la répercussion de l'action du NBS sur l'activité biologique du lysozyme.

La méthode la plus simple pour doser son activité lysante est la turbidimétrie [69] : on détermine l'augmentation de transmission d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* préparée selon la technique de FRAENKEL-CONRAT [70] : elle est obtenue en agitant fortement 20 mg d'une poudre acétonique de bactéries dans un mélange de 90 ml d'une solution tampon de phosphates monopotassique et disodique 0,15 M, à pH 6,1 et de 10 ml de NaCl à 1 %. La solution à doser est diluée avec le tampon phosphate de telle manière qu'elle contienne, par ml, de 4 à 10 μ g de lysozyme (exprimé en μ g de lysozyme d'œuf Armour). Au temps zéro on ajoute 0,1 à 0,5 ml de la solution de lysozyme à analyser à 5 ml de la suspension bactérienne placée dans la cuve d'un photomètre Meunier. Dans des intervalles de temps allant de 30 secondes à 2 minutes, la diminution de la densité optique est proportionnelle à la concentration en lysozyme. Toutes les mesures sont faites à 20°. Pour chaque essai on détermine 6 à 8 fois de suite les temps correspondant à une baisse de densité optique de 5 %

Pour chaque série de mesures on établit une courbe étalon des valeurs obtenues pour diverses concentrations connues de lysozyme.

CHAPITRE IV

DEGRADATION SPECIFIQUE DES PROTEINES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE

I. — HYDROLYSE TRYPSIQUE

L'hydrolyse trypsique se fait toujours sur un lysozyme dénaturé, oxydé ou réduit, car le lysozyme natif n'est pas attaqué par l'enzyme. La trypsine utilisée est un échantillon deux fois recristallisé, obtenu de la Maison Worthington (Freehold, N.J.) et contenant 50 % de sulfate de magnésium.

L'hydrolyse trypsique est faite à 37° et à pH 7,8. Le lysozyme est dissous dans l'eau distillée et la concentration en substrat est fixée à 1 %. Le pH est ajusté à 7,8 par addition de triméthylamine à 25 %. On ajoute alors la trypsine, en choisissant un rapport enzyme/substrat de 1/50° à 1/100°. Le temps moyen d'hydrolyse est de 2 heures. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de quelques gouttes d'acide acétique N.

II. — HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

La chymotrypsine n'attaque pratiquement pas le lysozyme natif et exige, comme la trypsine, une dénaturation préalable de la protéine. La chymotrypsine utilisée est un échantillon cristallisé, exempt de sels, fourni par la Maison Worthington (Freehold, N.J.).

L'hydrolyse chymotrypsique est faite à 37°, pendant 2 à 5 heures. Le lysozyme est dissous dans l'eau distillée et le pH est amené à 7,8 par addition de triméthylamine. La concentration en substrat est fixée à 1 %. Le rapport enzyme/substrat est généralement choisi entre 1/50° et 1/100°. L'action enzymatique est stoppée en ajustant le pH à 5 avec l'acide acétique N.

III. — ACTION DE LA CARBOXYPEPTIDASE

L'emploi de la carboxypeptidase permet de déterminer l'acide aminé C-terminal d'un peptide ou d'une protéine.

La carboxypeptidase contient souvent des impuretés (acides aminés libres), c'est pourquoi on la lave plusieurs fois à l'eau avant de l'utiliser.

La réaction a lieu à pH 7,5 et à 37°, en présence de diisopropyl-fluorophosphate (DFP). Des fractions aliquotes sont prélevées après différents temps d'hydrolyse, pour déterminer le temps de réaction permettant d'obtenir le meilleur rendement pour l'acide aminé C-terminal, sans détacher les acides aminés suivants. On arrête la réaction en amenant le pH à 4. On ajoute de l'alcool pour précipiter la protéine débarrassée de son acide aminé C-terminal et l'on conserve l'ensemble à 0° pendant une nuit. On centrifuge à froid; le surnageant contenant l'acide aminé C-terminal est concentré sous vide, puis chromatographié sur papier Whatman n° 1, dans le solvant A, et éventuellement rechromatographié dans d'autres solvants.

SEPARATION D'UN MELANGE DE PEPTIDES

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'ECHANGEURS D'IONS

1) *Chromatographie sur Dowex 50* $\times$ 2

Cette résine acide, échangeuse de cations, permet la chromatographie aussi bien de peptides courts que de peptides plus longs. La technique que nous avons adoptée est celle décrite par HIRS, MOORE et STEIN [71].

On laisse gonfler la résine sèche (50 % de 120 à 200 mesh, 50 % de 200 à 400 mesh) dans l'eau et on la lave ensuite par HCl N et NaOH N. Elle est finalement tamponnée avec une solution de citrate et d'acétate de Na 0,2 N ; pH 5,1, qui assure à la résine son gonflement maximum.

Les solutions employées pour tamponner la résine et pour la chromatographie sont décrites dans le *Tableau II*.

La résine tamponnée à pH 5,1 est introduite par petites fractions dans la colonne, qui est finalement lavée par de la soude 0,2 N, pour chasser l'ammoniac qui a pu se fixer pendant cette opération sur la résine acide. Ensuite, on tamponne la résine à pH 3,1 ; 0,2 M. Les dimensions de la colonne varient suivant la quantité de matériel chargée.

Le mélange de peptides, amené préalablement à sec, est repris par 2ml de tampon pH 2,2 ; 0,2 M et chargé sur le haut de la colonne, en prenant soin de ne pas altérer l'horizontalité de la surface de résine. La chromatographie est effectuée à la température de la pièce. On recueille des fractions de 3 ml. Après passage de 200 à 300 ml du tampon pH 3,1 ; 0,2 M, on adapte un gradient de pH et de Na⁺ (pH 3,1 ; 0,2 M à pH 5,1 ; 2,0 M), la chambre de mélange étant de 1 litre. La chromatographie est terminée en éluant la résine par une

solution tampon d'acétate de Na pH 6,5 ; 2,0 M et par des solutions tampons de pH croissant de 7,4 à 12,5 et de molarités allant de 0,75 à 1,0.

TABLEAU II

Composition des différentes solutions tampons utilisées au cours de la chromatographie sur Dowex 50 X 2 (par litre de solution)

pH	M	Acide citrique (g)	Acide acétique concentré (g)	NaOH 97 % (g)	Acétate de Na (g)	HCl concentré (g)	Acide borique (g)	KCl (g)
2,2	0,2	21		8,3		15,6		
3,1	0,2	21		8,3		11,6		
5,1	2,0	105	21,5	47,0	136			
6,5	2,0		2,5		272			
7,4	0,5			2,36			30,92	37,27
9,5	0,75			15,0			36,75	
10,3	0,75			15,0			27,75	
11,2	1,0			20,0			31,0	
12,3	1,0			20,0			20,0	
12,5	+ 1,0			50,0			20,0	

L'emplacement des peptides dans les éluats est repéré par dosage à la ninhydrine selon STEIN et MOORE [58]. Comme certains peptides ne réagissent pas quantitativement à la ninhydrine, il est préférable de les repérer après hydrolyse alcaline, effectuée en général sur 1/10^e des fractions recueillies. Les fractions correspondant à chaque pic sont réunies et dessalifiées. L'hydrolyse alcaline a été adoptée de préférence à l'hydrolyse en milieu chlorhydrique, où il est très difficile lorsque l'on est en présence d'un grand nombre d'échantillons à doser, d'empêcher une absorption d'ammoniac qui fausse les résultats.

2) Chromatographie sur Dowex 1 X 2 [72]

La résine Dowex 1 X 2 est une résine fortement basique, échangeuse d'anions. Elle possède certains avantages, comparée au Dowex 50 X 2 :

1) elle ne retient pratiquement pas les peptides riches en acides aminés aromatiques ;

2) l'emploi de solutions tampons volatiles pour l'élution des peptides évite une dessalification ultérieure.

La résine (200 à 400 mesh), livrée dans le commerce sous forme de poudre, est laissée gonfler dans l'eau. Elle est ensuite successivement lavée par NH_4OH 2N, eau, acide acétique N, HCl N, eau, NH_4OH 2N, eau et, finalement, par un tampon collidine à pH 8 (10 ml de collidine + 2,1 ml d'acide acétique à 30 % pour un litre).

On charge la colonne, dont les dimensions dépendent de la quantité de matériel à séparer, en introduisant par petites fractions la résine maintenant tamponnée à pH 8.

Le mélange de peptides est repris par le tampon collidine pH 8 et chargé sur la colonne. L'élution commence par le même tampon collidine pH 8. Dès que plus rien n'est élué à ce pH, on applique un gradient collidine-acide acétique N, suivi d'acide acétique 2 N. Finalement, on élue les peptides les plus acides et les plus aromatiques par l'acide acétique 2 N seul. On recueille des fractions de 5 ml et l'emplacement des peptides élués est déterminé, après hydrolyse alcaline et dosage à la ninhydrine, sur des fractions aliquotes, dans un tube sur deux.

Les fractions correspondant à un pic sont réunies et amenées à sec. Une analyse par chromatographie ou ionophorèse sur papier permet de séparer, ultérieurement, les différents peptides présents dans le même pic, par leurs R_f et leurs mobilités.

II. — FILTRATION SUR SEPHADEX

La filtration sur Sephadex a d'abord été décrite par PORATH [73, 74]. Cette méthode permet non seulement une séparation entre peptides de différents poids moléculaires (les peptides les plus longs étant élués les premiers), mais encore elle possède l'avantage de retenir les sels, rendant ainsi superflue une dessalification ultérieure.

• PRÉPARATION DE LA COLONNE :

Le gel Sephadex est mis à gonfler dans l'eau, pendant une nuit, et le gel est ensuite introduit dans une colonne, dont les dimensions varient selon la quantité de matériel à séparer. Le mélange de peptides est repris avec 6 ml d'eau et chargé sur la colonne. L'élution est également faite par l'eau. On recueille des fractions de 2 ml. 0,1 ml, prélevé dans un tube sur deux, est analysé, après hydrolyse alcaline, grâce au réactif à la ninhydrine.

Des quantités aliquotes des fractions réagissant à la ninhydrine sont analysées par chromatographie sur papier dans le solvant A. La révélation par la ninhydrine permet de réunir les tubes ayant les mêmes constituants.

La plupart du temps on observe, toutefois, la présence de plusieurs peptides dans certaines fractions ainsi réunies et il faut faire des chromatographies préparatives sur papier pour les séparer. Une purification ultérieure de ces peptides est souvent nécessaire, par ionophorèse préparative sur papier, à différents pH.

III. — DIALYSE FRACTIONNÉE

Lorsque l'on est en présence de peptides de différents poids moléculaires, il est possible de les séparer par dialyse fractionnée.

100 mg de lysozyme traités par 6 moles de NBS par mole de tryptophane et ayant subi une oxydation par l'acide performique sont dissous dans 8 ml d'eau et dialysés contre 60 ml d'eau distillée à 4°, dans un sac de cellophane (membrane Visking F/34). L'eau de dialyse est renouvelée après 1, 2, 4, 7, 24, 48, 72 et 96 heures et les différentes eaux de dialyse sont lyophilisées. Les constituants de chaque fraction sont ensuite purifiés par chromatographie et ionophorèse préparatives sur papier, et leur composition en acides aminés est déterminée dans l'autoanalyseur Technicon.

IV. — DESSALIFICATION DES PEPTIDES

Les pics renfermant les peptides provenant de la colonne Dowex 50 X 2 sont dessalifiés dans des colonnes de Dowex 50 X 2 de 25 X 2 cm, selon la méthode de HIRS, MOORE et STEIN [71], simplifiée par THAUREAUX-JOLLÈS [55].

La résine est préparée de la même façon que celle servant à la séparation du mélange de peptides : elle est introduite dans la colonne dans une solution tampon pH 5,1 ; 0,2 M. On la lave ensuite avec NH_4OH 2 M jusqu'à alcalinité, puis avec de l'eau, enfin avec de l'acide citrique 0,1 M jusqu'à pH 3.

La fraction à dessalifier, amenée à un pH égal ou inférieur à 5, est chargée sur la colonne, puis la résine est lavée avec 100 ml d'eau ; les peptides sont ensuite élués par NH_4OH 2 M. On recueille des fractions de 10 ml, en continuant l'élution jusqu'à ce que l'on ait obtenu 10 fractions alcalines. On régénère la colonne en lavant avec HCl 4 N, puis avec de l'eau, du NH_4OH 2 M, de l'eau et enfin de l'acide citrique 0,1 M.

La localisation des peptides, dans les fractions dessalifiées, est faite en chromatographiant 1/20^e de chaque fraction, évaporée à sec

préalablement dans un dessiccateur sur H_2SO_4 , sur papier Whatman n° 1, dans le solvant A. La feuille est révélée à la ninhydrine. Chaque peptide est caractérisé par son R_f . Les fractions contenant les différents peptides sont évaporées, séparément, sous vide, en présence de H_2SO_4 .

V. — PURIFICATION DES PEPTIDES

Très souvent, on observe dans les pics dessalifiés ou dans les pics provenant de la colonne Dowex 1 X 2 la présence de plusieurs peptides. Ceux-ci peuvent subir une première purification par chromatographie sur papier.

1) *Chromatographie préparative sur papier*

La substance correspondant à un pic et amenée à sec est reprise par l'acide acétique N et placée sur une feuille de papier Whatman n° 1, sur des points distants de 1 cm. Des points témoins sont déposés sur chaque côté du chromatogramme. Après chromatographie, pendant 24 heures, dans le solvant A, les points témoins sont révélés à la ninhydrine et les bandes correspondant aux différentes taches sont découpées et éluées par l'acide acétique N. L'éluat est concentré sous vide, dans un dessiccateur, sur NaOH.

2) *Ionophorèse préparative sur papier*

Une purification ultérieure peut être possible par ionophorèse sur papier, selon la méthode de KUNKEL et TISELIUS [75], à différents pH, en utilisant l'un ou l'autre des solvants proposés par RYLE et al. [76].

— *Solvant E*, pH 6,5 : pyridine : eau : acide acétique (100 : 900 : 4, v/v).

— *Solvant F*, pH 3,6 : pyridine : eau : acide acétique (10 : 890 : 100, v/v).

Il est fréquent qu'une seule tache avec un R_f déterminé au cours de la chromatographie préparative sur papier puisse cependant contenir un mélange de peptides.

Au cours de l'ionophorèse préparative sur papier, les techniques pour la répartition du matériel à séparer, la révélation des points témoins, l'élution des peptides, sont analogues à celles utilisées lors de la chromatographie préparative sur papier. Après avoir déposé sur le papier Whatman n° 1 une fraction aliquote du peptide à

étudier, on tamponne ce papier avec le solvant utilisé pour l'ionophorèse. La durée de l'ionophorèse est en général fixée à 2 heures, sous 750 v.

Chaque peptide est caractérisé par sa mobilité à un pH donné. La gamme témoin utilisée pour déterminer la mobilité relative des différents peptides comprend un mélange de glycolle, d'arginine et d'acide cystéique, ayant respectivement les mobilités suivantes : 0, + 1 et — 1.

CHAPITRE VI

ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES PEPTIDES

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER (ANALYSE QUALITATIVE)

Les peptides provenant de l'hydrolysat trypsique d'une protéine acétylée devaient tous contenir un résidu d'arginine C-terminal, dans le cas où aucune rupture non spécifique ne s'était produite. Il était donc important de caractériser, en premier lieu, ces peptides. Ceci a été fait, après chromatographie sur papier dans le solvant A, sur les peptides entiers, en utilisant le réactif de SAKAGUCHI [65], donnant une coloration rouge en présence de l'arginine. D'autres réactifs spécifiques permettent, dans ces conditions, le repérage de certains acides aminés sur le peptide entier : nous avons repéré l'histidine par la réaction de PAULI [77], la tyrosine par le réactif de GERNGROSS [78] et le tryptophane par le réactif d'EHRlich [79].

Une analyse qualitative de la composition en acides aminés des peptides est possible après hydrolyse totale (HCl 6N, 110°, 18 heures). L'hydrolysat est amené à sec, dans un dessiccateur sur NaOH et repris par l'eau. La chromatographie sur papier Whatman n° 1, en présence d'une gamme témoin d'acides aminés, est effectuée dans le solvant A, pendant 20 heures. La gamme témoin, révélée par le réactif à la ninhydrine, présente la composition suivante : a) groupe des bases ($R_f = 0,03-0,08$) renfermant lysine, histidine, arginine et cystine ou acide cystéique ; b) groupe I ($R_f = 0,14-0,16$) représenté par l'acide aspartique, la sérine et la glycine ; c) groupe II ($R_f = 0,25-0,27$) composé d'acide glutamique et de thréonine ; d) alanine ($R_f = 0,35$) ; e) tyrosine ($R_f = 0,43$) ; f) valine ($R_f = 0,55$) ; g) phénylalanine ($R_f = 0,63$) ; h) groupe des leucines ($R_f = 0,70-0,72$), renfermant leucine et isoleucine. Deux autres acides aminés peuvent être repérés dans l'hydrolysat du lysozyme réduit : ce sont la proline, ayant un R_f légèrement supérieur à l'alanine, caractérisée par sa

coloration bleue avec le réactif à base d'isatine [80], ainsi que la S-carboxyméthylcystéine, qui se forme au cours de la réduction et le traitement par l'acide iodacétique du lysozyme. Elle se sépare difficilement de l'acide glutamique au cours de la chromatographie dans différents solvants, mais peut être mise en évidence lors d'une ionophorèse à pH 3,6 [81].

Pour séparer les acides aminés contenus dans les groupes : bases, I, II et leucines, on découpe les niveaux correspondants et on les élue par l'eau. Les éluats sont ensuite rechromatographiés dans les solvants suivants :

- *Solvant G* : (bases) phénol tamponné à pH 4 [82].
- *Solvant H* : (groupes I et II) phénol tamponné à pH 10 [82].
- *Solvant I* : (leucines) butanol tamponné à pH 4 [82].

II. — CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE (ANALYSE QUANTITATIVE)

Toutes nos analyses ont été faites à l'aide d'un autoanalyseur Technicon *. La méthode utilisée a été celle décrite par PIEZ et MORRIS [83].

Les dimensions de la colonne sont $130 \times 0,9$ cm ; la résine employée est le Dowex 50 X 12. Toute l'opération est conduite à 60°. La résine est tamponnée à pH 2,91 ; 0,25 M (voir composition des tampons utilisés ci-après). Le produit à analyser est chargé au même pH. L'élution des acides aminés est obtenue par application d'un gradient avec augmentation croissante du pH et de la molarité d'un tampon citrate.

Tampon pH 2,91 ; 0,25 M

citrate de Na .. 24,4 g
acide citrique .. 81,2 g
eau q.s.p. 1 litre

Tampon citrate 2,4 M

— citrate de Na .. 235 g
— eau q.s.p. 1 litre

La détermination des acides aminés, après réaction avec la ninhydrine, est faite à deux longueurs d'onde 570 et 440 m μ , par un photomètre incorporé. La deuxième longueur d'onde permet la détermination de la proline. Un enregistreur donne le graphique des pics correspondant aux différents acides aminés.

A la fin de l'analyse, la colonne est régénérée en faisant passer le tampon citrate de Na pH 2,91 ; 0,25 M. Elle est ainsi prête à resservir. Une régénération de la colonne par la soude 0,2 N ne s'impose qu'après une dizaine d'analyses.

* Technicon Chromatography Corp., Chauncey, N.Y.

EXPOSE DES RESULTATS

A - Modifications par voie chimique : application au lysozyme

La désamination, la guanidination et l'acétylation du lysozyme ont été effectuées dans le même but : empêcher la trypsine de couper la liaison peptidique impliquant le groupement carboxylique de la lysine modifiée.

Le comportement des divers dérivés du lysozyme au cours de l'hydrolyse trypsique devait nous permettre d'évaluer le pourcentage d'inhibition pour chaque dérivé du lysozyme.

Parallèlement, l'étude de la valeur de l'azote aminé des différents dérivés, par dosage à la ninhydrine, devait nous donner des renseignements sur le nombre des groupes aminés masqués.

Afin de vérifier l'intégrité de la molécule de lysozyme, après les différents traitements chimiques, nous avons comparé les spectres ultraviolets des différents dérivés, ce qui nous permettait en même temps d'apprécier leur concentration (pour une même quantité de lysozyme natif, une fraction aliquote de l'échantillon de lysozyme modifié indiquait, en général, des maxima moins élevés, ce qui est dû à la présence de sels insuffisamment éliminés par dialyse).

CHAPITRE I

LYSOZYME DESAMINE

Le lysozyme a été désaminé en utilisant le nitrite de Na dans les conditions décrites par PHILPOT et SMALL [24, 18].

En partant de 120 mg de lysozyme, nous n'avons recueilli que 36 mg de lysozyme désaminé, soit un rendement de 30 %. Ce faible rendement est dû à une dialyse prolongée (60 heures) du produit, afin d'éliminer au maximum des artefacts de coloration dus à la présence de sels réagissant avec la ninhydrine et donnant de faux renseignements sur le nombre de groupements aminés libres dans la protéine modifiée. La même perte de produit à travers la membrane de dialyse est observée avec un lysozyme non modifié, soumis à une dialyse prolongée. Ce n'est donc point un effet dû à la modification chimique de la protéine.

I. — SPECTRE ULTRAVIOLET

Les spectres ultraviolets, en milieu acide ou alcalin, nous indiquent : 1) que le traitement par le nitrite de Na n'a pas modifié le spectre ultraviolet de la protéine de façon significative et 2) que le produit analysé ne contient plus de sels.

Nous ne donnons ici que le spectre ultraviolet en présence de HCl puisque la solubilité du lysozyme désaminé était meilleure en milieu acide.

II. — ETUDE DE LA VALEUR DE L'AZOTE AMINE PAR DOSAGE A LA NINHYDRINE

Le dosage à la ninhydrine se fait en présence d'un tampon phosphates, pH 7,8 ; 0,2 M, en comparant des quantités égales de lysozyme non modifié et de lysozyme désaminé.

Figure 1 : Spectres ultraviolets

- a) du lysozyme désaminé
(400 μ g/3 ml HCl 0,1 N)
- b) du lysozyme natif
(400 μ g/3 ml HCl 0,1 N)

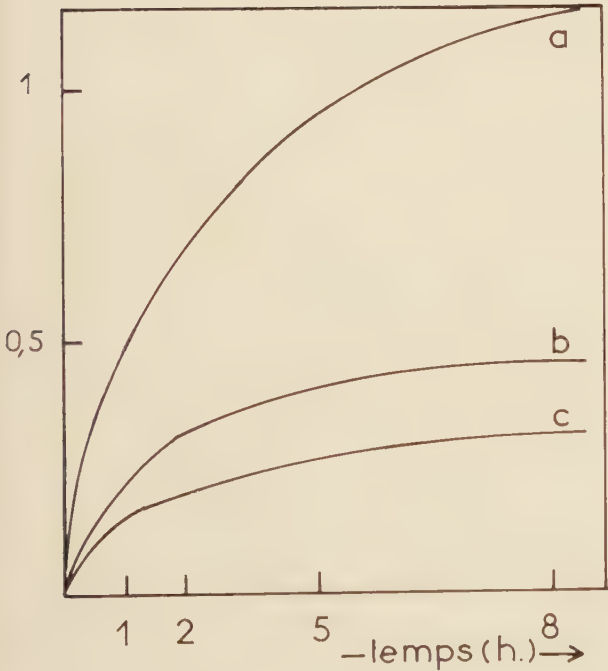
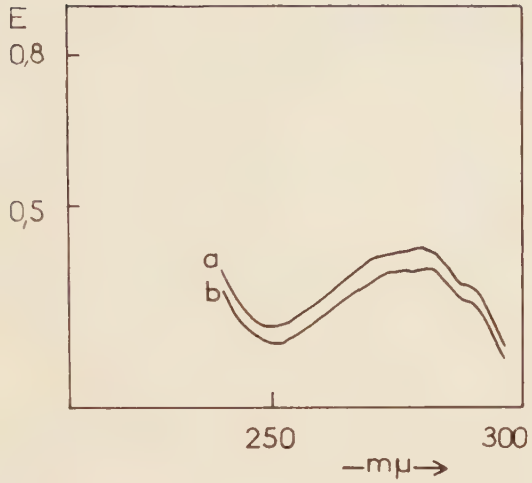


Figure 2 : Comportement à l'hydrolyse trypsique des lysozymes

- a) dénature par la chaleur
- b) désaminé
- c) natif

La moyenne de plusieurs déterminations pour chaque échantillon nous permet de conclure que la désamination du lysozyme est pratiquement complète.

III. — COMPORTEMENT A L'HYDROLYSE TRYPSIQUE

De l'examen de la *figure 2*, il ressort que la désamination inhibe l'action de la trypsine, après deux heures d'hydrolyse, d'environ 70 %.

CHAPITRE II

LYSOZYME GUANIDINE

La guanidination du lysozyme a été obtenue en utilisant le procédé décrit par HABEED [25, 26] où l'agent guanidinant est le nitrate de 3,5-diméthyl-1-guanylpirazole.

80 mg de lysozyme réduit ont été traités par le réactif proposé par HABEED et nous avons obtenu 63 mg de lysozyme guanidiné, correspondant à un rendement de 80 %.

I. — SPECTRE ULTRAVIOLET

Il ressort de l'examen de la *figure 3* que le produit obtenu est pur et que le traitement n'a pas eu de répercussions significatives sur le spectre ultraviolet.

II. — EVALUATION DU POURCENTAGE DE GUANIDINATION PAR LA METHODE DE SANGER

Dans le cas du lysozyme guanidiné, le dosage à la ninhydrine des groupements aminés libres n'a pas pu être utilisé, car les résidus de lysine transformés en résidus d'homoarginine donnent également une réaction positive avec la ninhydrine.

C'est pourquoi nous avons fait réagir le lysozyme guanidiné avec le fluorodinitrobenzène (FDNB), selon la technique décrite par SANGER. Après hydrolyse acide (HCl 11 N, 110°, 6 heures) d'une fraction aliquote du produit obtenu, nous avons chromatographié la partie acidosoluble dans le solvant A, en même temps qu'une quantité égale de lysozyme non modifié soumis au même traitement. Le niveau correspondant à la ϵ -DNP-lysine a été élué par le mélange acétone :

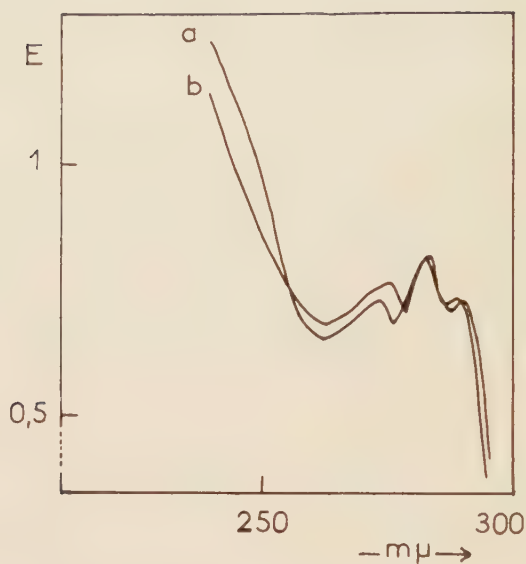
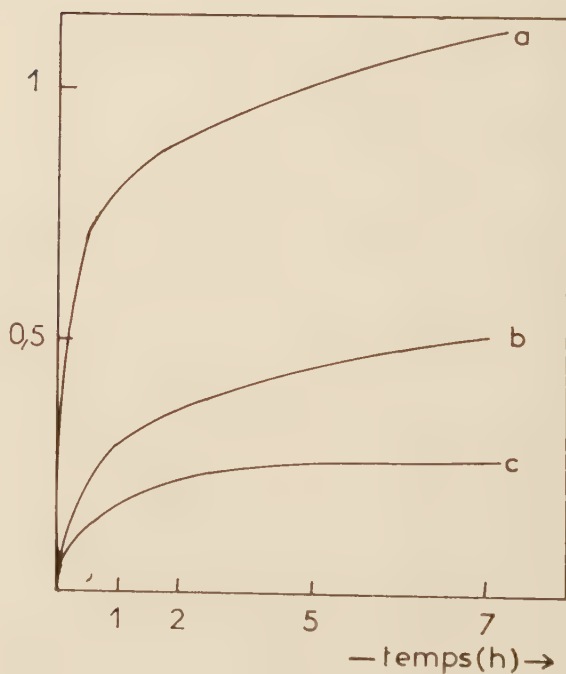


Figure 3 : Spectres ultraviolets

- a) du lysozyme guanidiné
(1 mg/3 ml NaOH 0,1 N)
- b) du lysozyme natif
(1 mg/3 ml NaOH 0,1 N)

Figure 4 : Comportement
à l'hydrolyse trypsique
des lyozymes

- a) réduit
- b) guanidiné
- c) natif



HCl N et les deux échantillons ont été examinés au spectrophotomètre Beckman, modèle « DU », à 360 m μ . D'après les chiffres obtenus, nous avons conclu que seulement 35 % du lysozyme avaient été guanidinés.

III. — COMPORTEMENT A L'HYDROLYSE TRYPSIQUE

L'examen de la *figure 4* fait ressortir qu'après deux heures d'hydrolyse la guanidination du lysozyme inhibe l'action de la trypsine à 75 %.

CHAPITRE III

LYSOZYME ACÉTYLE

La première acétylation du lysozyme a été obtenue en utilisant le procédé donné par FRAENKEL-CONRAT [27], l'agent acétylant étant l'anhydride acétique.

En partant de 500 mg de lysozyme réduit, nous avons pu recueillir après dialyse et lyophilisation, 320 mg de lysozyme acétylé, ce qui correspond à un rendement de 63 %.

I. — SPECTRE ULTRAVIOLET

Le spectre n'a pas été modifié de façon significative par le traitement du lysozyme mais, par contre, il ressort de l'examen de la *figure 5* que le produit obtenu contient encore des sels (environ 30 %), c'est-à-dire que le rendement de l'opération n'est, en définitive, que de 50 %. Ceci peut être expliqué par une dialyse prolongée (60 heures) du produit acétylé.

II. — ETUDE DE LA VALEUR DE L'AZOTE AMINE PAR DOSAGE A LA NINHYDRINE

Le dosage a été fait en présence d'un tampon phosphates, pH 7,8 ; 0,2 M, en faisant appel à 1 mg de lysozyme natif ou à 1 mg de lysozyme acétylé.

La moyenne de plusieurs déterminations nous donne pour l'échantillon du lysozyme acétylé une valeur anormalement basse. Cette faible coloration avec la ninhydrine s'explique par le fait que le produit n'est pas très soluble dans la zone de pH requise pour le dosage. La détermination a été faite uniquement sur la partie surna-

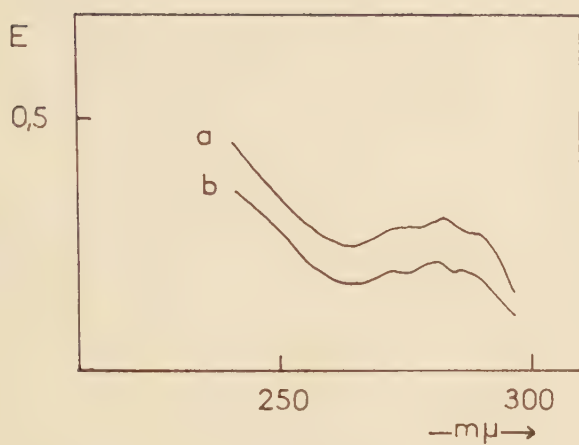


Figure 5 : Spectres ultraviolets des lysozymes

a) natif (400 μ g/3 ml NaOH 0,1 N)

b) acétylé (400 μ g/3 ml NaOH 0,1 N)

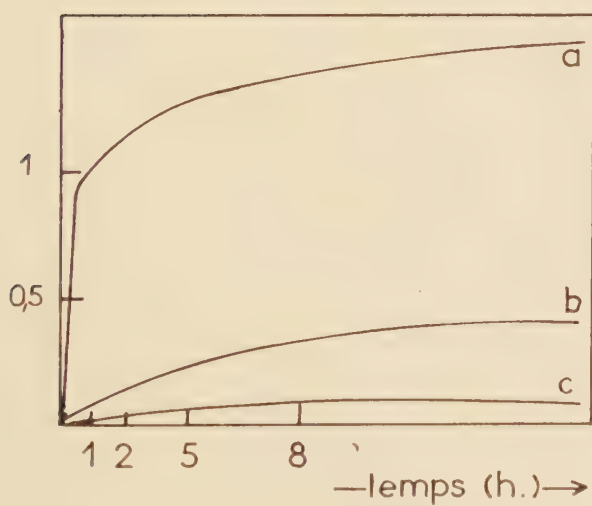


Figure 6 : Comportement à l'hydrolyse trypsique des lysozymes

a) réduit ; b) acétylé ; c) natif

geante, après élimination du culot. En tout cas, les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure. Il est nécessaire d'étudier le comportement du lysozyme acétylé au cours de l'hydrolyse trypsique, afin de vérifier s'il y a une inhibition due à l'acétylation.

III. — COMPORTEMENT A L'HYDROLYSE TRYPSIQUE

Il ressort de l'examen de la *figure 6* que l'acétylation inhibe l'action de la trypsine, après deux heures d'hydrolyse, d'environ 90 %.

CHAPITRE IV

COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS AVEC LES TROIS LYSOZYMES MODIFIES

TABLEAU III

Comparaison des caractéristiques des différents dérivés modifiés

Lysozyme	Rendements lors de la préparation du dérivé (%)	Groupements aminés modifiés (%)	Inhibition de l'activité trypsique (%)	Solubilité au cours de l'hydrolyse trypsique
Désaminé ..	30	100	70	très mauvaise
Guanidiné ..	80	35	75	mauvaise
Acétylé	50	100	90	dissolution après 30 minutes

Avant de faire le choix de la méthode la plus utile pour une étude approfondie du lysozyme modifié, nous devons discuter les résultats exposés brièvement dans le *Tableau III*.

A première vue, le faible rendement en lysozyme désaminé semble à lui seul s'opposer à l'emploi de cette méthode. Mais nous devons, toutefois, signaler qu'en variant légèrement les conditions expérimentales et en réduisant le temps de dialyse du produit primaire obtenu, il nous serait certes possible d'en augmenter le rendement. C'est la très mauvaise solubilité du lysozyme désaminé au cours de l'hydrolyse trypsique qui nous a fait renoncer à cette méthode et qui explique la faible attaque du substrat par la trypsine.

Le lysozyme guanidiné, s'il apparaît avec un rendement suffisant, n'a pu être guanidiné qu'à 35 % dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées. De plus, lui aussi montre une mauvaise solubilité au cours de l'hydrolyse trypsique. Cela explique aussi sa résistance à l'action de la trypsine qui devrait être moindre, étant donné que seul un tiers du substrat a été guanidiné.

Le lysozyme acétylé, par contre, nous a donné des résultats encourageants. Aussi bien par le dosage à la ninhydrine qu'après détermination des groupements acétylés (voir plus loin), nous pouvons conclure que l'acétylation du lysozyme est très poussée. La parfaite solubilité après trente minutes d'hydrolyse nous permet d'espérer un bon rendement en « unités trypsiques ». Pour expliquer la faible augmentation de la valeur de l'azote aminé après deux heures d'hydrolyse, nous devons envisager que l'acétylation, si elle empêche l'hydrolyse trypsique au niveau des résidus de lysine modifiée, doit également provoquer, dans l'ensemble, une certaine inhibition de l'action de la trypsine vis-à-vis de la molécule entière modifiée. En faveur de cette hypothèse parle aussi la présence d'un « core » relativement important et des rendements en « unités trypsiques » plus faibles que ceux obtenus avec le lysozyme réduit non modifié.

Nous avons finalement choisi l'acétylation comme méthode pour la modification chimique spécifique du lysozyme, méthode qui, d'après les résultats des expériences préliminaires, devait permettre un blocage satisfaisant des groupements ϵ -aminés de la lysine.

CHAPITRE V

LES PEPTIDES ("UNITES TRYPSIQUES") OBTENUS APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE DU LYSOZYME ACÉTYLE

I. — PREMIERE ACÉTYLATION

500 mg de lysozyme réduit et traité par l'acide iodacétique sont acétylés par l'anhydride acétique, selon le procédé de FRAENKEL-CONRAT [27]. Une dialyse prolongée (56 heures) nous a permis d'obtenir un produit exempt de sels (vérifié par son spectre ultraviolet), mais une partie du lysozyme a ainsi pu migrer à travers la membrane de cellophane et a été perdue. Après lyophilisation, nous avons recueilli 170 mg de lysozyme acétylé.

• HYDROLYSE TRYPSIQUE :

140 mg de lysozyme acétylé, dissous dans l'eau à la concentration de 1/100°, sont amenés à pH 7,8 par addition de triméthylamine. Le rapport enzyme/substrat a été fixé à 1/25°. L'hydrolyse trypsique est faite à 37°, pendant 5 heures.

L'hydrolysats est amené à sec, 1/100° est chromatographié directement dans le solvant A, dans le but d'obtenir rapidement un renseignement sur la marche de l'hydrolyse.

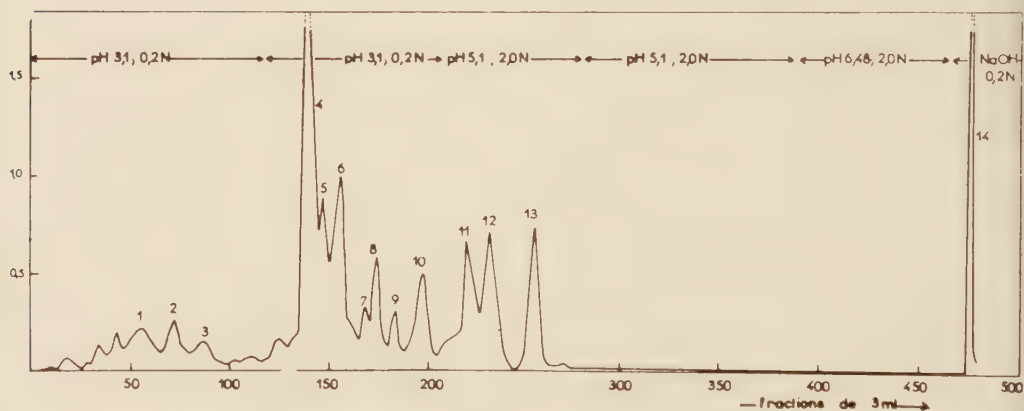
En effet, les peptides apparus après hydrolyse trypsique du lysozyme acétylé sont, en partie, différents de ceux trouvés avec un lysozyme non modifié ; de plus, la présence de leucine libre, provenant d'une coupure trypsique caractéristique de l'enchaînement C-terminal Arg-Leu du lysozyme, nous indique que l'hydrolyse trypsique s'est faite de manière satisfaisante.

• CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50 X 2 :

La séparation des peptides de l'hydrolysât trypsique a été obtenue par chromatographie sur résine échangeuse d'ions, Dowex 50 X 2 (100 × 0,9 cm). L'hydrolysât trypsique, préalablement amené à sec et repris par le tampon pH 2,2 ; 0,2 M est chargé sur la colonne tamponnée à pH 3,1 ; 0,2 M. Toute l'opération est conduite à la température ordinaire, selon la technique indiquée dans la partie « Méthodes ».

Après hydrolyse alcaline de 1/10^e des fractions de 3 ml recueillies au cours de la chromatographie, nous avons fait un dosage à la ninhydrine qui nous indique l'emplacement des peptides élués.

Figure 7 : Séparation sur Dowex 50 X 2 des peptides contenus dans l'hydrolysât trypsique de 10 μ M de lysozyme acétylé

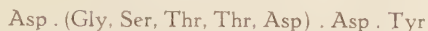


Après dessalification des différents pics et purification des peptides (toujours selon les conditions indiquées dans la partie « Méthodes »), nous avons analysé leur composition en acides aminés, soit par chromatographie sur papier, soit par autoanalyseur.

Les pics 1-3 n'ont pas été analysés, car la réaction de Sakaguchi sur les peptides entiers indiquait qu'ils ne contenaient pas d'arginine.

• ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DU LYSOZYME ACÉTYLÉ :

Le *pic n° 4* contient essentiellement des peptides avec un faible rendement, provenant de coupures dues à la chymotrypsine souillant l'échantillon de trypsine utilisé, tels que :



$$R_f^* 0,03; m = -0,4-0,6$$

unité chymotrypsique dont la structure a été déterminée par JOLLÈS [84].

Le peptide provenant du *pic n° 5* a été le plus intéressant que nous ayons obtenu avec cette colonne. Il s'agit, en effet, du :



$$R_f 0,23-0,27; m = -0,42-0,50$$

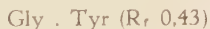
permettant pour la première fois de placer l'unité trypsique connue Cys · Lys [85] au sein de la molécule de lysozyme. L'enchaînement Gly · (Ser, Thr, Asp) · Val · Glu (NH₂) · Ala · Try fait partie d'une unité trypsique se terminant par Ileu · Arg, caractérisé par JOLLÈS [84]. L'enchaînement C-terminal de ce peptide, Ala · Try, a été vérifié en faisant agir la carboxypeptidase. Après 2 minutes d'action, il y avait déjà apparition de tryptophane et également de traces d'alanine.

Le *pic n° 6* contient un peptide déjà caractérisé après hydrolyse trypsique du lysozyme non modifié [84], la liaison peptidique Lys · Arg présentant à ce niveau une certaine résistance à l'action de la trypsine :



$$R_f 0,04 \sim 0,07$$

Le *pic n° 7* est moins intéressant et ne contient que le peptide provenant d'une coupure chymotrypsique.



Le *pic n° 8*, par contre, renferme une unité trypsique classique déjà connue [62] :



$$R_f 0,03; m \quad 0,30 \text{ (pH } 3,6)$$

que nous avons retrouvée, prolongée par le résidu leucine, dans le *pic n° 9* :



correspondant à l'enchaînement C-terminal du lysozyme [86].

Le *pic n° 11* contient un peptide avec un deuxième résidu de lysine sensible à l'action de la trypsine dans les conditions classiques. L'en-

* Tous les R_f sont déterminés par chromatographie dans le solvant A.

chainement avait déjà pu être élucidé en le reconstituant à partir de séquences obtenues après différentes hydrolyses enzymatiques [84] :

Ser . Leu . Gly . Asp (NH₂) . Try . Val . Cys . Ala . Ala . Lys . Phe .
Glu . Ser . Asp (NH₂) . Phe . Asp (NH₂) . Glu (NH₂) . Ala . Thr .
Thr . Asp (NH₂) . Arg

(R_r 0)

Le pic n° 12 renferme une unité trypsique classique [85] :

Asp(NH₂) . Arg (R_r 0,02 ; m = + 0,5)

et contient également le peptide suivant, correspondant à l'enchaînement N-terminal du lysozyme [84] :

NH₂ . Lys . Val . Phe . Gly . Arg

Nous n'avons pu obtenir ce dernier à l'état pur.

Le pic n° 13 contient le peptide :

Ileu . Arg (R_r 0,35 ; m = + 0,8)

qui, d'après la formule développée du lysozyme [14], continue l'enchaînement du peptide caractérisé dans le pic n° 5, permettant ainsi d'y retrouver deux unités trypsiques déjà connues [84].

TABLEAU IV

*Comportement par chromatographie et ionophorèse sur papier
et structure des peptides isolés après hydrolyse trypsique
du lysozyme acétylé (TrA)*

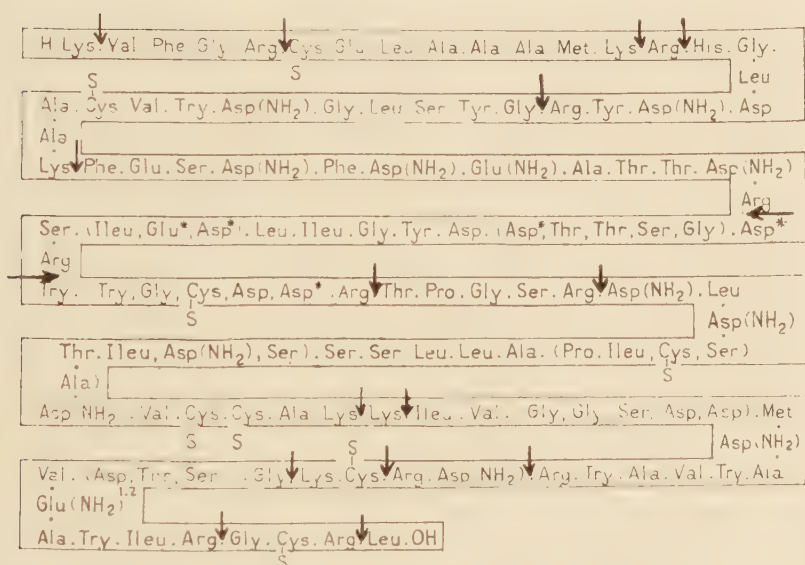
Peptides	R _r	m (pH 6,5)	Structure
TrA 4	0,03	— 0,4-0,6	Asp . (Gly, Ser, Thr, Thr, Asp) . Asp . Tyr
TrA 5	0,23-0,27	— 0,42-0,50	Cys . Lys . Gly . (Ser, Thr, Asp) . Val . Glu (NH ₂) . Ala . Try
TrA 6	0,04-0,07		Cys . Glu . Leu . Ala . Ala . Ala . Met . Lys . Arg
TrA 7	0,43		Gly . Tyr
TrA 8	0,03	+ 0,30 (pH 3,6)	Gly . Cys . Arg
TrA 9	0,15		Gly . Cys . Arg . Leu . OH
TrA 11	0,0		Ser . Leu . Gly . Asp (NH ₂) . Try . Val . Cys . Ala . Ala . Lys . Phe . Glu . Ser . Asp (NH ₂) . Phe . Asp (NH ₂) . Glu (NH ₂) . Ala . Thr . Thr . Asp (NH ₂) . Arg
TrA 12	0,02	+ 0,5	Asp (NH ₂) . Arg
TrA 13	0,35	+ 0,8	Ileu . Arg

R_r = dans le solvant A ; m = mobilité du peptide calculée par rapport à celle de l'arginine égale à +1 ou par rapport à celle de l'acide cystéique égale à — 1 ; m = 0 pour le glycocole ; TrA appellation indiquant qu'il s'agit d'une protéine réduite (r), soumise à une hydrolyse trypsique (T) et préalablement acétylée (A).

• DISCUSSION DES RÉSULTATS :

Avant de discuter les résultats de cette première acétylation, il est indispensable de rappeler la structure chimique du lysozyme de blanc d'œuf de poule, élucidée récemment par JOLLÈS [14]. Nous empruntons ici la formule développée parue dans cette publication.

TABLEAU V
La formule développée
du lysozyme de blanc d'œuf de poule [14]



* Il n'a pas été déterminé si ces résidus sont amidés ou non (J. JOLLÈS et P. JOLLÈS, *Compt. Rend.*, 253 (1961) p.

Les flèches indiquent les coupures provoquées par l'action de la trypsine sur la protéine non modifiée, c'est-à-dire, théoriquement, l'hydrolyse trypsique donne naissance à 14 peptides, ayant soit un résidu de lysine, soit un résidu d'arginine comme acide aminé C-terminal, ainsi qu'à deux fois la lysine libre, une fois l'arginine libre et une fois la leucine libre, acide aminé C-terminal de la protéine. Mais, pratiquement, il faut noter l'obtention avec un fort rendement de deux unités trypsiques contenant, à la fois, Lys et Arg : Lys . Val . Phe . Gly . Arg et Cys . Glu . Leu . Ala . Ala . Met . Lys . Arg.

Si, par contre, les résidus de lysine ont préalablement été bloqués par un agent chimique adéquat, nous pouvons nous attendre, après hydrolyse trypsique de la protéine modifiée, à voir apparaître 11 unités tryptiques présentant l'arginine comme acide aminé C-terminal ainsi que la leucine libre.

Parmi ces 11 unités tryptiques, 4 renfermeront un résidu de lysine et la cinquième 2 résidus de cet acide aminé, car, comme il ressort de la formule développée du lysozyme, exposée plus haut, la protéine contient un enchaînement Lys-Lys.

Ainsi, si la méthode marche parfaitement, nous devons caractériser les unités tryptiques suivantes :

TABLEAU VI
Unités tryptiques théoriques d'un lysozyme acétylé

TrM 1	... NH ₂ . Lys . Val . Phe . Gly . Arg
TrM 2	... Cys . Glu . Leu . Ala . Ala . Ala . Met . Lys . Arg
TrM 3	... His . Gly . Leu . Asp . Asp (NH ₂) . Tyr . Arg
TrM 4	... Gly . Tyr . Ser . Leu . Gly . Asp (NH ₂) . Try . Val . Cys . Ala . Ala . Lys . Phe . Glu . Ser . Asp (NH ₂) . Phe . Asp (NH ₂) . Glu (NH ₂) . Ala . Thr . Thr . Asp (NH ₂) . Arg
TrM 5	... Asp . (Gly, Ser, Thr, Thr, Asp) . Asp . Tyr . Gly . Ileu . Leu . (Asp, Glu, Ileu) . Ser . Arg
TrM 6	... Try . (Try, Gly, Cys, Asp, Asp) . Arg
TrM 7	... Thr . Pro . Gly . Ser . Arg
TrM 8	... Asp (NH ₂) . Leu . Asp (NH ₂) . (Ser, Cys, Ileu, Pro) . Ala . Leu . Leu . Ser . Ser . (Ser, Asp (NH ₂), Ileu, Thr, Ala) . Asp (NH ₂) . Val . Cys . Cys . Ala . Lys . Lys . Ileu . Val . (Gly, Gly, Ser, Asp, Asp) . Met . Asp (NH ₂) . Ala . Try . Val . Ala . Try . Arg
TrM 9	... Asp (NH ₂) . Arg
TrM 10	... Cys . Lys . Gly . (Ser, Thr, Asp) . Val . Glu (NH ₂) . Ala . Try . Ileu . Arg
TrM 11	... Gly . Cys . Arg
TrM 12	... Leu . OH
TrM =	Protéine modifiée (M), réduite (r) et traitée par la trypsine (T)

Le *Tableau VI* nous permet de comparer facilement nos résultats expérimentaux de la première acétylation :

Trois de nos peptides (TrA 5, 6 et 11) contiennent un résidu de lysine modifiée ayant résisté à l'action de la trypsine. Tandis que le TrA 6 a déjà été fréquemment obtenu au cours de l'hydrolyse tryp-

sique du lysozyme non modifié, les deux autres peptides (TrA 5 et 11) n'ont jamais pu être trouvés dans un hydrolysate tryptique. Il faut, toutefois, signaler que les deux peptides montrent l'intervention des impuretés chymotryptiques présentes dans l'échantillon de trypsine utilisé. Il était donc utile, dans d'autres expériences, de prétraiter la trypsine par l'acide chlorhydrique N/16 [72], afin d'en éliminer les impuretés chymotryptiques.

Parmi les unités tryptiques classiques, nous avons pu retrouver les peptides appelés dans le *Tableau VI* : TrA 8, 9 et 12.

Les trois derniers peptides proviennent de coupures chymotryptiques : TrA 4, 7 et 13.

Si la caractérisation des deux peptides TrA 5 et 11 constituait un résultat encourageant, démontrant la validité de la méthode pour empêcher la trypsine de couper au niveau des résidus de lysine modifiée, l'ensemble des résultats n'est guère satisfaisant. Ce n'est pas l'acétylation, toutefois, qui doit être mise en cause, mais certainement les conditions utilisées pour l'hydrolyse tryptique de la protéine acétylée, et particulièrement les impuretés chymotryptiques. C'est pourquoi nous avons décidé de recommencer l'expérience : 1) en changeant les conditions de l'hydrolyse tryptique, 2) en prétraitant la trypsine par le HCl N/16, et 3) en faisant appel à une méthode d'acétylation qui devait nous permettre d'acétyler complètement la protéine.

II. — DEUXIEME ACETYLATION

500 mg de lysozyme réduit et traité par l'acide iodacétique sont deux fois acétylés en utilisant, cette fois-ci, la méthode décrite par WONG et LIFNER [54]. Le mélange réactionnel final est dialysé pendant 24 heures contre de l'eau distillée et ensuite lyophilisé. On obtient 600 mg d'une poudre blanche qui contient encore environ 20 % de sels (vérifié par le spectre ultraviolet). Nous avons donc ici un rendement de près de 100 %.

• RÉSULTATS DE LA DÉTERMINATION DES GROUPEMENTS ACÉTYLES :

En raison de l'insolubilité partielle du lysozyme acétylé à pH 7,8, la détermination de l'azote aminé, par dosage à la ninhydrine, pour évaluer le nombre de groupements aminés libres est rendue très difficile. C'est pourquoi nous avons essayé de déterminer directement les groupements acétyles présents dans la molécule après acétylation.

Il nous a semblé intéressant de déterminer non seulement les groupements N-acétyles, mais de nous rendre compte également du degré d'acétylation des groupements hydroxyles libres de la protéine. C'est pourquoi nous avons choisi la méthode décrite par LUDOWIEG et DORFMAN [64].

Il ressort effectivement de nos déterminations que tous les groupements aminés et hydroxylés du lysozyme ont été acétylés. Nous avons trouvé 29 groupes acétyles par molécule de lysozyme. Ceci correspond à : 6 groupes ϵ -aminés de la lysine, 1 groupe α -aminé de la lysine, 11 groupes hydroxyles de la sérine, 7 groupes hydroxyles de la thréonine, 1 noyau imidazole de l'histidine et 3 noyaux p-hydroxyphénol de la tyrosine.

- HYDROLYSE TRYPSIQUE :

420 mg du lysozyme acétylé, dans une solution à 1 %, à pH 7,8, sont soumis à l'hydrolyse trypsique. Le rapport enzyme/substrat est fixé à 1/50^e et la durée de l'hydrolyse à 2 heures, à 37°. La trypsine utilisée a été préalablement traitée par l'acide chlorhydrique N/16 dans une solution à 5 %, pendant 18 heures à 37°, dans un tube scellé, afin d'inactiver les impuretés chymotrypsiques, qui s'étaient montrées particulièrement gênantes précédemment.

L'hydrolysats trypsique est amené à sec ; une fraction aliquote est chromatographiée dans le solvant A. Après révélation de la feuille à la ninhydrine, la présence d'un certain nombre de peptides avec différents R_f , et de la leucine libre permettent de conclure que l'hydrolyse trypsique s'est normalement effectuée.

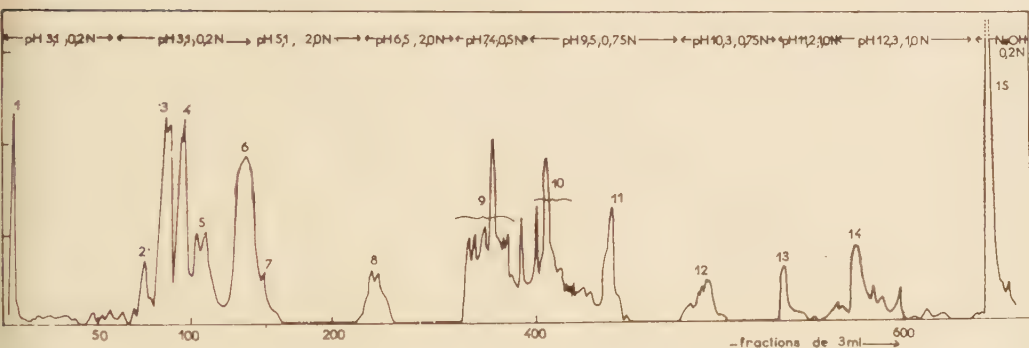
- CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50 X 2 :

Nous avons préféré, cette fois-ci, réduire la hauteur de la colonne utilisée et nous avons essayé d'obtenir une séparation des peptides riches en résidus aromatiques et basiques en ayant recours à l'utilisation de tampons plus alcalins que le dernier employé au cours de la première acétylation (pH 6,8), permettant ainsi de fractionner d'avantage les différents peptides qui, sans cela, étaient élués ensemble avec la soude 0,2 N, à la fin de la colonne.

Dimensions de la colonne : 16 $\times$ 1 cm. L'hydrolysats a été chargé dans un tampon à pH 2,2 ; 0,2 M sur la colonne tamponnée à pH 3,1 ; 0,2 M. Toute l'opération a été conduite à la température de la pièce, selon la technique indiquée au chapitre « Méthodes ».

Nous avons recueilli des fractions de 3 ml. L'emplacement des peptides a été repéré, après hydrolyse alcaline de fractions de 0.1 ml, par dosage à la ninhydrine.

Figure 8 : Séparation sur Dowex 50 X 2 des peptides contenus dans l'hydrolysât trypsique de 30 μ M de lysozyme acétylé



Le pic 1 contenait la leucine libre, acide aminé C-terminal du lysozyme.

Les pics 2 à 15 ont été dessalinés sur Dowex 50 X 2. Les peptides purifiés, soit par chromatographie sur papier, soit par ionophorèse sur papier, ont ensuite été analysés quant à leur composition en acides aminés.

• ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DU LYSOZYME ACÉTYLÉ (TrAt) :

Le pic n° 2 n'a pas été étudié en raison de son faible rendement.

Le pic n° 3 contenait le peptide :

Cys . Glu . Leu . Ala . Ala . Ala . Met . Lys . Arg

R_f 0 ~ 0.02 ; $m = -0.4$

que nous avons déjà trouvé au cours de la première acétylation.

Le pic n° 4 renferme l'enchaînement :

Gly . Cys . Arg R_f 0.02 à 0.04

et le pic n° 5 le même enchaînement prolongé par la leucine.

R_f 0.14-0.16 ; $m = 0$

Ces deux peptides ont également été isolés à partir du premier lysozyme acétylé.

Dans le *pic* n° 6, nous avons retrouvé le peptide :

Cys . Lys . Gly . (Ser, Thr, Asp) . Val . Glu (NH₂) . Ala . Try

mais prolongé ici par Ileu . Arg. C'est-à-dire que nous nous trouvons en présence d'une unité trypsique du lysozyme acétylé, correspondant au peptide attendu théoriquement (dans la colonne précédente, du premier lysozyme acétylé, les impuretés chymotrypsiques avaient provoqué la coupure au niveau du résidu de tryptophane). Le peptide a un $R_f = 0,08$ à $0,10$ et sa mobilité était zéro au cours de l'ionophorèse sur papier, à pH 6,5.

Afin de vérifier d'une autre manière la composition de ce peptide, nous l'avons soumis à une hydrolyse chymotrypsique (2 heures à 37° ; rapport enzyme/substrat 1/50° ; pH 7,8). L'hydrolysat chymotrypsique, préalablement amené à sec, a ensuite été soumis à une ionophorèse à pH 6,5. La révélation du point témoin indiquait la présence de 3 taches ninhydrine-positives, avec les mobilités suivantes :

- a) $m = -0,42$ à $0,50$, correspondant au peptide ayant perdu l'enchaînement Ileu . Arg ;
- b) $m = 0$, représentant le peptide non attaqué par la chymotrypsine, et
- c) $m = +0,8$, caractéristique de l'unité Ileu . Arg.

Les 2 points non révélés ont été élués par l'acide acétique N et l'hydrolyse totale (HCl 6N, 20 heures, 110°) de chacun des trois enchaînements confirmait la composition en acides aminés exposée plus haut.

Un deuxième peptide a pu être caractérisé dans le *pic* n° 6, il s'agit du :

Thr . Pro . Gly . Ser . Arg ($R_f = 0,05$)

unité trypsique classique, dont la structure a été établie par JOLLÈS [85].

Le *pic* n° 8 contenait une autre unité trypsique bien connue [84] :

His . Gly . Leu . Asp . Asp (NH₂) . Tyr . Arg
 R_f 0,04 à 0,08 ; $m = 0$ et $-0,2$

Il est intéressant de constater que la même unité trypsique, provenant d'un lysozyme non modifié, montre un R_f de 0,02 et une mobilité $= +0,1$. Les constantes obtenues par nous semblent indiquer que l'histidine a également été acétylée, ce qui explique sa neutralité ou sa légère acidité au cours de l'ionophorèse, le groupement acétyle qui s'est fixé sur le résidu d'histidine lui enlève son caractère basique. La fonction acide de l'acide aspartique ne se trouve plus qu'en présence du groupement guanidiné de l'arginine.

Le pic n° 10 renfermait deux peptides différents dont la structure a été établie par JOLLÈS [87, 84] :

a) Try . (Try, Gly, Cys, Asp, Asp) . Arg

R_f 0,08 ; $m = -0,3$

b) Asp . (Gly, Ser, Thr, Thr, Asp) . Asp . Tyr . Gly . Ileu . Leu .
(Glu, Asp, Ileu) . Ser . Arg

R_f 0 ~ 0,04 ; $m = -0,3$

Dans les deux cas, il s'agit d'unités tryptiques classiques.

Le pic n° 15 (élué par la soude 0,2 N) contient une unité tryptique renfermant un résidu de lysine modifiée. La même séquence a déjà été obtenue au cours de la première acétylation, mais dépourvue des deux acides aminés N-terminaux (Gly . Tyr), étant donné que la trypsine n'avait pas été prétraitée et provoquait ainsi des coupures dues à l'action de la chymotrypsine. L'enchaînement que nous avons pu caractériser par ses constantes et sa composition en acides aminés avait la formule suivante [84] :

Gly . Tyr . Ser . Leu . Gly . Asp (NH₂) . Try . Val . Cys . Ala . Ala .

Lys . Phe . Glu . Ser . Asp (NH₂) . Phe . Asp (NH₂) . Glu (NH₂) .

Ala . Thr . Thr . Asp (NH₂) . Arg

$R_f = 0$ à 0,06 ; $m = -0,3$ à $-0,5$

• DISCUSSION DES RÉSULTATS :

L'examen du *Tableau VII* fait ressortir que nous avons retrouvé au cours de cette deuxième acétylation 8 des 11 unités tryptiques du lysozyme modifié (*Tableau VI*) auxquelles nous devons nous attendre si le blocage des groupements ϵ -aminés de la lysine inhibait l'action de la trypsine. D'autre part, nous n'avons pu retrouver, avec un rendement suffisant pour que nous décidions leur analyse, des peptides provenant de coupures non spécifiques dues à la présence d'impuretés chymotrypsiques dans l'échantillon de trypsine utilisé. L'inactivation de ces traces d'impuretés par un prétraitement en présence d'acide chlorhydrique N/16 a donc été efficace. En rappelant que deux autres unités tryptiques classiques ont déjà été caractérisées au cours de la première acétylation, nous pouvons dès maintenant conclure que cette méthode permet, avec une technique simple, de vérifier, rapidement, par un autre moyen d'investigation, la structure primaire d'une protéine.

Il ne nous restait plus qu'à retrouver le peptide renfermant l'enchaînement Lys . Lys ; ce peptide est relativement long (38 acides aminés) et, de plus, renferme deux résidus de tryptophane. Ceci peut expliquer que nous n'ayons jamais pu l'élué de la colonne Dowex

TABLEAU VII

Comportement par chromatographie et ionophorèse sur papier et structure des peptides isolés après hydrolyse trypsique du lysozyme acétylé (TrAt)

Unités trypsiques théoriques d'un lysozyme acétylé*	Peptides	R _f	m (pH 6,5)	Structure
TrM 2	TrAt 3	0-0,02	-0,4	Cys . Glu . Leu . Ala . Ala . Met . Lys . Arg
TrM 11	TrAt 4	0,02-0,04		Gly . Cys . Arg
TrM 10	TrAt 5	0,14-0,16	0	Gly . Cys . Arg . Leu-OH
	TrAt 6a	0,08-0,10	0	Cys . Lys . Gly . (Ser, Thr, Asp) . Val . Glu (NH ₂) . Ala . Try . Ileu . Arg
TrM 7	TrAt 6b	0,05		Thr . Pro . Gly . Ser . Arg
TrM 3	TrAt 8	0,04-0,08	0 et 0,2	His . Gly . Leu . Asp . Asp (NH ₂) . Tyr . Arg
TrM 6	TrAt 10a	0,08	-0,3	Try . (Try, Gly, Cys, Asp, Asp) . Arg
TrM 5	TrAt 10b	0-0,04	-0,3	Asp . (Gly, Ser, Thr, Thr, Asp) . Asp . Tyr . Gly Ileu . Leu . (Asp, Glu, Ileu) . Ser . Arg
TrM 4	TrAt 15	0-0,06	0,3 à -0,5	Gly . Tyr . Ser . Leu . Gly . Asp (NH ₂) . Try Val . Cys . Ala . Ala . Lys . Phe . Glu . Ser . Asp (NH ₂) . Phe . Asp (NH ₂) . Glu (NH ₂) . Ala Thr . Thr . Asp (NH ₂) . Arg

R_f = dans le solvant A ; m = mobilité du peptide calculée par rapport à celle de l'arginine égale à 1 ou par rapport à celle de l'acide cystéique égale à -1 ; m = 0 pour le glyco-colle ; TrAt = appellation indiquant qu'il s'agit d'une protéine réduite (r), soumise à une hydrolyse trypsique (T) et préalablement acétylée totalement (At).

* D'après le tableau VI.

50 X 2. Comme nous n'avons pu déceler aucune indication d'une coupure après l'une des deux lysines du peptide (présence de lysine libre ou des deux peptides dont l'un est facilement repéré par la présence d'un résidu de proline dans sa molécule et l'autre par ses résidus de tryptophane), nous avons conclu qu'aucune coupure non spécifique ne s'était produite, mais que ce long peptide très aromatique a été retenu par la résine Dowex 50 X 2.

Pour en fournir la preuve, nous avons décidé de faire un essai de séparation à l'aide d'une autre résine : le Dowex 1 X 2.

III. — TROISIEME ACETYLATION

Nous avons acétylé 500 mg de lysozyme réduit et traité par l'acide iodacétique dans les mêmes conditions que celles utilisées au cours de la deuxième acétylation. Le lysozyme acétylé a ensuite été soumis à une hydrolyse trypsique (2 heures à 37°, pH 7,8, concentration en substrat 1 %, rapport enzyme/substrat 1/100°, trypsine prétraitée par HCl N/16).

La séparation des peptides provenant de l'hydrolyse trypsique a été effectuée sur une colonne de Dowex 1 X 2 (100 X 1 cm) selon la technique décrite dans la partie « Méthodes ».

Nous avons pu caractériser 14 pics, dont un seul, le pic n° 13, retenait notre attention. La fraction éluée, correspondant à ce pic, se caractérisait tout d'abord par sa coloration rose-violet, ce qui pouvait indiquer la présence de quantités importantes de tryptophane partiellement dégradé (nous n'avons jamais trouvé jusqu'ici un pic coloré). Après avoir amené cette fraction à sec, nous en avons chromatographié une quantité aliquote sur papier Whatman n° 1, dans le solvant A, et nous avons trouvé la présence d'un peptide avec un $R_f = 0$; ce peptide donnait une coloration bleue avec le réactif d'Ehrlich. L'hydrolyse totale d'une autre partie du peptide nous indiquait la présence de proline dans sa molécule, ainsi qu'un rapport $\text{Lys}/\text{Arg} = 2$.

Ces observations nous ont incités à croire que nous étions bien en présence de l'unité trypsique qu'il nous restait à caractériser.

Nous avons décidé de soumettre ce peptide, après hydrolyse totale, à une analyse quantitative sur colonne, dans l'autoanalyseur Technicon. Nous avons bien pu retrouver tous les acides aminés escomptés et particulièrement le rapport caractéristique qui existe entre valine, leucine et isoleucine (3 : 3 : 3), mais nous étions en présence

d'un excès d'acides aminés, surtout en ce qui concerne l'acide glutamique, l'acide aspartique et le glycolle. Nous en avons conclu que l'unité trypsique renfermant l'enchaînement Lys.Lys était encore souillée par d'autres fragments peptidiques, mais que nous étions réellement en présence de la dernière unité qui nous restait à caractériser (rapport Lys/Arg = 2, rapport Val : Leu : Ileu = 3 : 3 : 3, présence de proline et de tryptophane dans la molécule).

CHAPITRE VI

COMPARAISON DE CES RESULTATS AVEC CEUX OBTENUS GRACE AUX METHODES CLASSIQUES ET CONCLUSIONS

Si nous comparons maintenant nos résultats, dans leur ensemble, avec ceux obtenus grâce aux méthodes d'hydrolyse enzymatique classiques, nous pouvons conclure que :

- 1° L'acétylation du lysozyme a effectivement empêché la coupure de la chaîne polypeptidique par la trypsine au niveau des groupements carboxyliques des résidus de lysine modifiée. La coupure n'a eu lieu qu'après les résidus d'arginine.
- 2° Connaissant la structure primaire du lysozyme, il a été possible de retrouver rapidement et de caractériser par leurs constantes les unités tryptiques classiques du lysozyme, ainsi que les séquences prolongées renfermant un résidu de lysine modifiée.
- 3° Cette méthode n'a pas seulement permis de vérifier, par un autre moyen d'investigation, la structure primaire du lysozyme, mais par cette technique il a été possible de localiser le dipeptide Cys . Lys dans l'enchaînement du lysozyme.

En définitive, nous avons pu démontrer par ce travail que la modification chimique des protéines par acétylation constitue une méthode valable pour obtenir une dégradation spécifique ultérieure par la trypsine, donnant ainsi naissance à des séquences prolongées, ce qui facilite considérablement l'établissement de la structure primaire d'une protéine de poids moléculaire élevé. De plus, c'est la première fois que l'on a vérifié, par séparation et caractérisation de toutes les unités tryptiques de la protéine chimiquement modifiée, la validité de telles méthodes dans l'établissement de la structure primaire d'une protéine.

B - Etude de la coupure spécifique des protéines par voie chimique au niveau des résidus de tryptophane

L'intérêt considérable que représente une peptidase « chimique » pour l'étude de la structure des protéines, nous a incités à appliquer la méthode proposée par PATCHORNIK, LAWSON et WITKOP [45, 46] au lysozyme et à la caséine kappa. Cette méthode utilise le N-bromo-succinimide (NBS) pour la coupure spécifique de la chaîne polypeptidique au niveau des résidus de tryptophane.

Grâce à la formule développée du lysozyme, établie par JOLLÈS et al. [14], nous connaissons avec certitude les enchaînements Try . Val (2 fois), Try . Arg, Try . Ileu ; les enchaînements Try . Gly et Try . Try sont fort probables.

Après action du NBS sur le lysozyme, suivie d'une dinitrophénylation, nous devons donc pouvoir mettre en évidence 4 DNP-amino-acides (DNP-Val, DNP-Arg, DNP-Ileu et DNP-Gly) avec un rendement suffisant (fixé à 20-40 % par les auteurs dans les conditions expérimentales optimales).

Une confirmation plus sûre de l'utilité de la méthode devait être obtenue par l'isolement et l'analyse de quelques peptides formés après action du NBS sur le lysozyme.

Nous avons également étudié l'allure des spectres ultraviolets des protéines traitées par le NBS et la répercussion de ce traitement sur l'activité du lysozyme.

L'application de l'action du NBS à la caséine kappa devait pour la première fois déterminer les acides aminés impliqués dans les liaisons peptidiques « Try-acide aminé ».

Nous avons finalement essayé de caractériser le dérivé du tryptophane, tel qu'il se forme dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées.

CHAPITRE 1

APPLICATION AU LYSOZYME

I. — DETERMINATION DU MILIEU REACTIONNEL

L'importance des conditions expérimentales utilisées pour la réaction entre le NBS et le lysozyme ressort du *Tableau VIII* établi par RAMACHANDRAN et WITKOP [48].

TABLEAU VIII

Conditions pour la scission du lysozyme par le N-bromosuccinimide (NBS) ou le N-bromoacétamide (NBA) et rendement des nouveaux aminoacides N-terminaux libérés par ce procédé

Milieu réactionnel	Moles de réactif/ mole de tryptophane	Nouveaux résidus N-terminaux formés (mole/mole)
Acide acétique 70 % ..	3 NBA	Val 0,06; « Leu » 0,02
Acide acétique 70 % ..	6 NBA	} Val 0,03; Phe 0,03; Ala 0,01; Ser 0,01
Urée 6 M; pH 4,15 ..	6 NBA	
Formate-acétate pH 4,15; 0,2 M	1,6 NBS	Gly 0,04; Ser 0,03
Formate-acétate pH 4,15; 0,2 M	2,5 NBS	Val 0,01
Formate-acétate pH 4,15; 0,2 M	5 NBS	Val 0,06
Acétate de lithium 8 M; pH 4,15	1,6 NBS	{ Val 0,05; Ser 0,02; Gly 0,015; Phe 0,01
Acétate de lithium 8 M; pH 4,15	2,5 NBS	
Acétate de lithium 8 M; pH 4,15	5 NBS	Val 0,03
Acétate de lithium 12 M; pH 4,15	3 NBA	Val 0,02
Formate-acétate pH 4,15; 0,2 M	3 NBA	{ Val 0,33; Phe 0,08; « Leu » 0,18; Arg 0,06

Ceci nous a incités à faire une série d'expériences, en faisant varier le milieu réactionnel et le nombre de moles de NBS réagissant par mole de tryptophane.

Afin de nous rendre compte, globalement, de la quantité de nouveaux résidus N-terminaux apparus après action du NBS, nous avons utilisé le dosage à la ninhydrine. L'augmentation de l'azote aminé nous permet d'évaluer le pourcentage des nouveaux résidus α -aminés formés. Il est à signaler, en outre, que par des dosages effectués immédiatement et après 15 minutes de réaction entre le NBS et le lysozyme, nous avons pu établir que la réaction est instantanée.

Dans toutes nos expériences, la concentration en lysozyme, dans le mélange réactionnel, a été fixée à 1 %. Le Tableau IX résume les résultats obtenus :

TABLEAU IX

Augmentation de l'azote aminé (en %) après action de quantités croissantes de NBS (exprimé en moles/mole de tryptophane) sur le lysozyme, en présence d'acide acétique de 50-80 %

Milieu réactionnel : acide acétique				
	50 %	60 %	70 %	80 %
Lysozyme + 2 NBS	1,8	2,8	1,6	5,0
Lysozyme + 4 NBS	6,3	6,1	6,9	7,5
Lysozyme + 6 NBS	8,2	19,2	10,1	26,0
Lysozyme + 8 NBS	30,5	20,1	35,0	26,0

(Chaque résultat représente la moyenne de 3 déterminations)

Un autre essai, conduit dans les mêmes conditions que les précédents, mais avec un lysozyme préalablement dénaturé par la chaleur, a montré que l'augmentation de l'azote aminé, en présence d'acide acétique à 60 %, donne les mêmes résultats qu'avec le lysozyme natif.

Une dernière série d'expériences a été faite en présence d'un tampon acétate de Na, pH 4, à des molarités de 0,05, 0,1 et 0,2 M. Dans tous les cas, l'addition du NBS au lysozyme provoquait la formation d'un précipité d'autant plus fort que le nombre de moles de NBS ajouté était plus grand. Ceci nous a fait éliminer ce tampon pour notre étude car notre but était, ultérieurement, de séparer les différents peptides formés, par chromatographie.

En considérant les résultats exprimés dans le *Tableau IX*, il est possible de constater que, dans tous les cas, l'augmentation de l'azote aminé va en croissant avec l'augmentation du nombre de moles de NBS ajoutés par mole de tryptophane de la protéine, et ceci indépendamment du milieu réactionnel. On peut admettre que 6 moles de NBS/mole de tryptophane permettent de rompre la chaîne peptidique au niveau de tous les résidus de tryptophane ; une augmentation du NBS au delà de ce rapport provoque un nouvel accroissement du chiffre exprimant l'augmentation de l'azote aminé. Ceci permet de craindre que le brome libéré au cours de la réaction attaque également les résidus de tyrosine et finalement provoque la coupure de la chaîne peptidique au niveau de leurs groupements carboxyliques. D'autre part, cet agent peut provoquer une trop forte oxydation et dégradation de la protéine amenant encore d'autres coupures non spécifiques.

Nous avons donc choisi, pour nos essais futurs, les conditions expérimentales suivantes : milieu réactionnel : acide acétique 60 %, nombre de moles de NBS/mole de tryptophane : 6.

II. — CARACTERISATION DES LIAISONS ROMPUES : APPARITION DE NOUVEAUX ACIDES AMINES N-TERMINAUX

100 mg de lysozyme sont dissous dans 5 ml d'acide acétique à 60 %. On y ajoute 45,72 mg de NBS préalablement dissous dans 5 ml d'acide acétique à 60 %.

Le mélange réactionnel est amené à sec et ensuite repris par 10 ml d'eau. Le pH est amené à 8 par addition de triméthylamine à 25 %. On y ajoute 50 mg de fluorodinitrobenzène (FDNB) et l'on vérifie de nouveau le pH. La solution est ensuite portée sur un agitateur magnétique où elle reste pendant 4 heures, à 20°, et à l'abri de la lumière. A la fin de la réaction, nous avons obtenu un précipité et une phase liquide. Le précipité est lavé à l'éther pour éliminer l'excès de FDNB. C'est le précipité (75 mg) qui contient tous les peptides formés par la réaction du NBS avec le lysozyme.

Des quantités aliquotes du précipité ont été hydrolysées pendant 2 et 8 heures, en présence de HCl 10,7 N, à 110°. Les hydrolysats ont été dilués par l'eau et extraits par l'éther, ce qui nous a donné une phase éthérosoluble et une phase acidosoluble.

Les DNP-aminoacides contenus dans la phase acidosoluble sont séparés, par leurs différents R_f , dans le solvant A. La DNP-arginine qui se trouve dans cette phase donne encore une réaction positive avec le réactif de Sakaguchi.

La séparation des DNP-aminoacides éthérosolubles est souvent délicate et demande l'application de plusieurs méthodes de chromatographie sur papier. Nous avons utilisé au cours de nos expériences les solvants B et C.

Les DNP-aminoacides ont été élués par le mélange acétone : HCl N (1/1, v/v), amenés à sec et repris ensuite par 3 ml de bicarbonate de Na à 1 % pour la détermination quantitative au spectrophotomètre, à 360 m μ . Une gamme de DNP-alanine sert de référence. Le tableau suivant résume nos résultats :

TABLEAU X
*Rendements (en %) des DNP-aminoacides
obtenus après action du NBS sur le lysozyme*

	Solvant			
	A	A	B	B
Temps d'hydrolyse (h)	2	8	2	8
DNP-Ser	—	—	32	24
DNP-Gly	—	—	33	16
DNP-Val	—	—	45	60
DNP-« Leu »	—	—	38	65
DNP-Arg	35	26	—	—

Aucune méthode de chromatographie sur papier ne permet la séparation de DNP-Leu de DNP-Ileu. La seule manière de caractériser ces deux DNP-aminoacides consiste à régénérer les acides aminés libres. La tache correspondant au mélange DNP-Leu - DNP-Ileu a été éluee, et amenée à sec. La régénération des acides aminés libres, selon la technique indiquée au chapitre « Méthodes », nous a montré que le mélange renfermait de la leucine et de l'isoleucine en proportions égales.

Si l'on compare les résultats résumés dans le *Tableau X* avec la formule développée du lysozyme [14], on constate qu'ils sont en excellent accord avec elle, sauf en ce qui concerne la présence de DNP-Ser et de DNP-Leu. L'apparition de ces deux derniers aminoacides est due à des coupures non spécifiques. Nous les discuterons plus loin.

Pour confirmer d'une façon différente ces résultats, il nous a paru intéressant d'isoler et d'analyser quelques peptides formés après action du NBS sur le lysozyme.

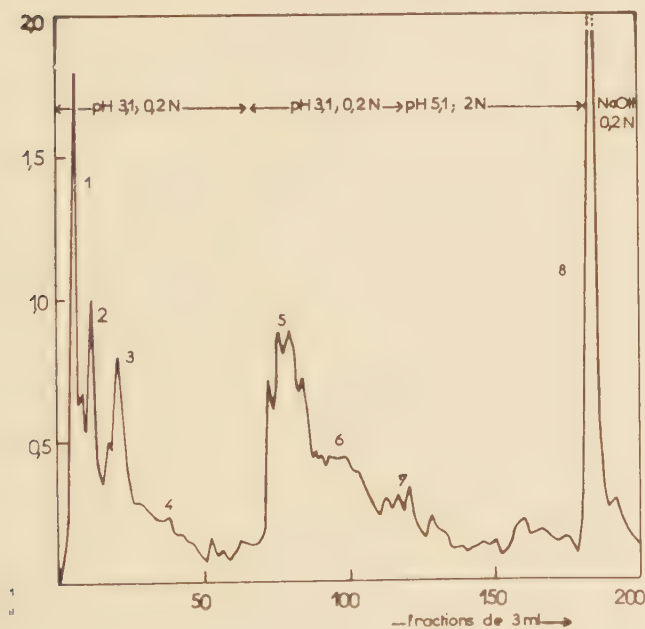
III. — ESSAIS DE SEPARATION ET D'ANALYSE DES PEPTIDES FORMES APRES ACTION DU NBS

1) Chromatographie sur Dowex 50 $\times$ 2

200 mg de lysozyme ont été traités par le NBS dans les conditions adoptées définitivement pour toutes nos expériences : 6 moles de NBS/mole de tryptophane, acide acétique 60 %.

Le produit, amené à sec, a ensuite été soumis à une oxydation par l'acide performique ; cette oxydation, qui transforme chaque résidu de cystine en 2 résidus d'acide cystéique, rend les peptides contenant

Figure 9 : Séparation sur Dowex 50 X 2 des peptides provenant de la réaction entre lysozyme et NBS



ce nouvel acide aminé aptes à être chromatographiés. Cette précaution a dû être prise, car malgré le pouvoir oxydant du NBS, qui oxyde et coupe certains ponts disulfures, cette réaction n'est pas complète [48]. D'autre part, les produits de transformation du trypto-

phane sont très complexes [45] et leur dégradation par une oxydation ultérieure pourrait rendre certains plus aptes à la chromatographie sur échangeurs d'ions. L'oxydation par l'acide performique des 200 mg de lysozyme traités par le NBS a été obtenue par la méthode de MUELLER, PIERCE, DAVOLL et DU VIGNEAUD [63].

Le produit, repris par une solution tampon à pH 2,2 ; 0,2 M, a été chargé sur une colonne de Dowex 50 X 2 (15 × 0,9 cm), préalablement tamponnée à pH 3,1 ; 0,2 M. L'élution est faite d'abord avec le tampon pH 3,1 ; 0,2 M et ensuite en appliquant un gradient de pH et de molarité, allant de pH 3,1 ; 0,2 M à pH 5,1 ; 2,0 M. En fin d'opération, la résine a été traitée par NaOH 0,2 N. Nous avons recueilli des fractions de 3 ml. Les pics ont été repérés grâce à un dosage à la ninhydrine, effectué après hydrolyse alcaline d'une fraction aliquote.

Les pics 1, 2 et 3, constitués d'un mélange très complexe, n'ont pas permis d'aboutir à la purification d'un peptide caractéristique.

Les pics 5 à 7, dessalifiés sur Dowex 50 X 2, renfermaient, chacun, plusieurs peptides qui ont dû être séparés et purifiés par chromatographie et ionophorèse préparatives sur papier.

• PEPTIDES ANALYSÉS ET DISCUSSION DES RÉSULTATS :

Les pics n° 5, 6 et 7 renfermaient chacun le seul peptide obtenu avec un bon rendement : Val . Ala . Try *, précédé lui-même par un résidu de tryptophane. Ce tripeptide, dont la structure a été établie par JOLLÈS [84], a un $R_f = 0,54-0,60$. Il s'agit là d'une coupure spécifique du NBS.

Dans le *pic n° 6*, nous avons trouvé le peptide :



qui provient d'une coupure non spécifique intervenue après un résidu de tyrosine [84].

Le *pic n° 7* contenait le peptide :



qui semble être l'enchaînement C-terminal du lysozyme. Il doit donc s'agir là d'une coupure non spécifique intervenue après un résidu d'acide cystéique. Enfin nous avons trouvé de la leucine libre dans le *pic n° 7*.

* Try = dérivé du tryptophane, obtenu après action du NBS.

C'étaient là des résultats très décevants, d'autant plus que la dinitrophénylation des nouveaux résidus N-terminaux apparus après action du NBS sur le lysozyme nous avait indiqué la réalité des coupures spécifiques avec un bon rendement.

Nous avons donc décidé d'essayer la séparation des peptides par un autre moyen : la filtration sur Sephadex.

2) Filtration sur Sephadex

Des expériences préliminaires avec des colonnes de Sephadex G-50 et G-75, en milieu aqueux et en présence de NaCl 0,05 M, nous avaient toujours donné les mêmes résultats quant à la séparation des peptides provenant d'un lysozyme traité par le NBS.

Nous avons donc choisi le gel Sephadex G-50 et préféré opérer en milieu aqueux.

250 mg de lysozyme traité par le NBS et ayant subi une oxydation par l'acide performique, ont été repris par 20 ml d'eau et la suspension (la dissolution n'est pas complète) a été chargée sur la colonne (27 × 3 cm). Nous avons recueilli des fractions de 2 ml. La présence des peptides dans les éluats a été déterminée par dosage à la ninhydrine, après hydrolyse alcaline, de fractions aliquotes.

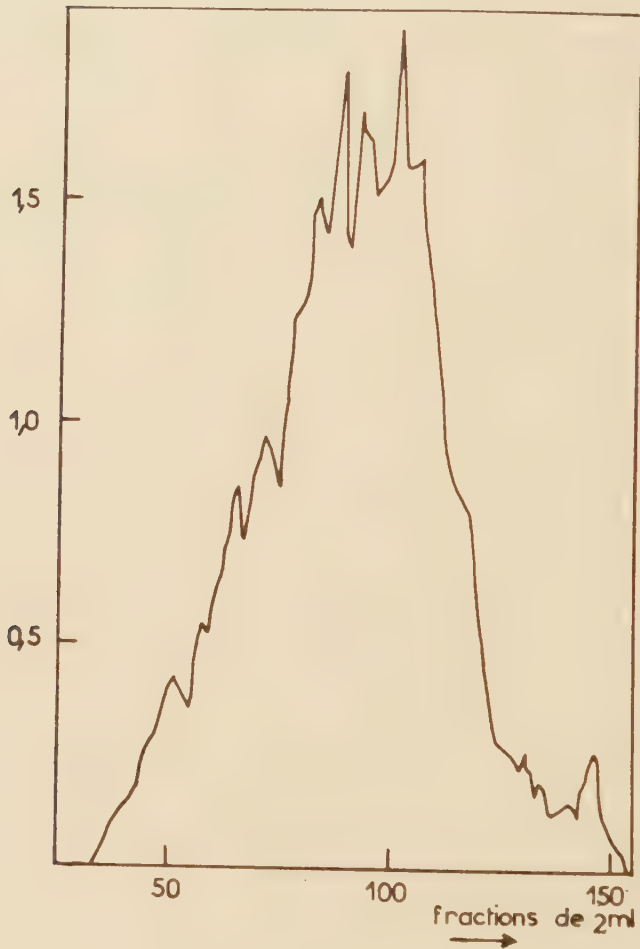
La mauvaise séparation des pics a rendu nécessaire un autre moyen de purification des peptides dans les tubes ayant donné une réaction positive avec la ninhydrine. Dans ce but, nous avons prélevé 0,1 ml dans un tube sur deux et nous avons chromatographié ces prélèvements dans le solvant A.

La *figure 11* a bien fait ressortir le fait que la filtration sur Sephadex est fonction de la grosseur de la molécule. Les premiers éluats contiennent les substances avec le plus haut poids moléculaire (ici la molécule de lysozyme non attaquée), tandis que dans les derniers tubes (119-150) a été élué le tripeptide Val. Ala. Try *, caractérisé par son R_f (0.54-0.60).

Nous avons réuni les tubes 44-66, 67-87, 88-118 et 119-150 qui contiennent les mêmes constituants. Pour l'étude et l'analyse des peptides provenant d'une coupure spécifique provoquée par le NBS, nous avons choisi ceux des tubes (88-118 et 119-150) qui, à en juger par la position d'élution, ainsi que par le R_f de leurs constituants, devaient renfermer les peptides qui nous intéressent.

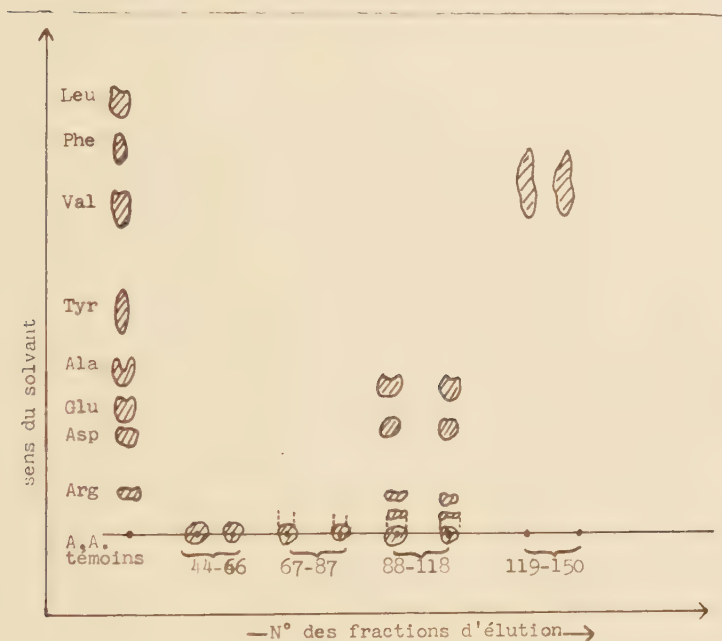
Le contenu des tubes 88-118 a été amené à sec et 1/3 du matériel a été purifié par chromatographie préparative sur papier dans le solvant A. Après révélation d'un point témoin, les bandes corres-

Figure 10 : Filtration sur Sephadex G-50 des peptides provenant de 250 mg de lysozyme traité par le NBS



pendant aux différentes taches ont été découpées et éluées par l'acide acétique N. Les éluats ont ensuite été concentrés sous vide, dans un dessiccateur, sur NaOH. Une purification ultérieure a été obtenue par des ionophorèses préparatives sur papier, à pH 6,5.

Figure 11 : Repérage par chromatographie dans le solvant A des peptides provenant du lysozyme traité par le NBS, après passage sur Sephadex G-50



Malgré tous nos efforts pour purifier et isoler les peptides provenant de coupures spécifiques du NBS, nous n'avons pu caractériser, grâce à leurs constantes, que les trois peptides suivants :

- 1) Arg . Leu (R_f 0,30 ; $m = + 0,3-0,5$), déjà trouvé parmi les peptides provenant de la colonne Dowex 50 X 2 ;
- 2) Ileu . Arg . Gly (R_f 0,10-0,12 ; $m = + 1,2$) ;
- 3) Arg . Asp (NH_2) . Arg (R_f 0 ; $m = + 1,1$) ;

qui, tous les trois, proviennent d'une coupure non spécifique d'une liaison peptique impliquant un résidu d'acide cystéique.

Par contre, les tubes 119-150 contenaient à l'état presque pur le tripeptide Val . Ala . Try *, provenant d'une coupure spécifique du NBS. Le peptide était souillé par un autre que nous avons déjà caractérisé précédemment : Ser . Leu . Gly . Asp . Try *, peptide où le NBS avait coupé la chaîne peptidique au niveau d'un résidu de tyrosine.

En définitive, ce deuxième essai de séparation des peptides provenant de l'action du NBS sur le lysozyme a également été décevant, car, en dehors du Val . Ala . Try *, nous n'avons pu retrouver aucun des morceaux que nous attendions d'après nos premières expériences, en caractérisant les nouveaux résidus N-terminaux apparus par dinitrophénylation.

3) *Dialyse fractionnée*

Une dernière tentative pour isoler et caractériser les peptides provenant de coupures spécifiques après action du NBS sur le lysozyme a été faite en soumettant les produits de la réaction à une dialyse fractionnée.

100 mg de lysozyme ont été traités par 45 mg de NBS, en présence d'acide acétique 60 %, selon la méthode utilisée jusqu'ici, et ont ensuite subi une oxydation par l'acide performique. Le produit, préalablement amené à sec, a été repris par 8 ml d'eau et a été dialysé contre 60 ml d'eau distillée, à 4°. L'eau de dialyse a été recueillie, puis changée après 1, 2, 4, 7, 24, 48, 72 et 96 heures. Les différentes eaux de dialyse ont finalement été lyophilisées.

1/30^e de chaque fraction a été chromatographié dans le solvant A. Après révélation de la feuille de chromatographie à la ninhydrine, nous avons pu constater que chaque dialysat contenait un grand nombre de taches de R_f différents. En outre, les dialysats de 1 à 24 heures contenaient pratiquement les mêmes constituants.

Des chromatographies et des ionophorèses préparatives sur papier des fractions provenant de 1 à 24 heures de dialyse ont permis de caractériser, par leur R_f, leur mobilité et leur coloration avec la ninhydrine les différents constituants, ce qui a permis de réunir tous ceux dont les constantes étaient égales.

Une analyse de leur composition en acides aminés, effectuée soit par chromatographie sur papier, soit avec un autoanalyseur, nous a permis de conclure que nous avons pu retrouver les peptides suivants :

- 1) Val . Ala . Try * (R_f 0,54-0,60) (m = 0);
- 2) Lys . Val . Phe . Gly . Arg (R_f 0,05 ; m = + 1,1);
- 3) (Gly, Cys, Asp, Asp) . Arg . Thr . Pro . Gly . Ser . Arg . Asp (NH₂) . Leu . Asp (NH₂) . (Ser, Cys, Ileu, Pro) . Ala . Leu . Leu . Ser . Ser . (Ser, Asp (NH₂), Ileu, Thr, Ala) . Asp (NH₂) . Val . Cys . Cys . Ala . Lys . Lys . Ileu . Val . (Gly, Gly, Ser, Asp, Asp) . Met . Asp (NH₂) . Ala . Try * (R_f 0 ; m = + 0,2);
- 4) Arg . Asp (NH₂) . Arg . Cys . Lys . Gly . (Ser, Thr, Asp) . Val . Glu (NH₂) . Ala . Try * (R_f 0 ; m = + 0,2).

- DISCUSSION DES ESSAIS DE SÉPARATION DES PEPTIDES FORMÉS APRÈS ACTION DU NBS SUR LE LYSOZYME :

TABLEAU XI
Peptides isolés après action du NBS sur le lysozyme

N°	Peptides (structure)	R _f (solvant A)	m _r (pH 6,5)
1	Val . Ala . Try *	0,54-0,60	0
2	Ser . Leu . Gly . Asp (NH ₂) . Try *	0,40-0,42	
3	Arg . Leu	0,35	+ 0,3-0,5
4	Leu . OH	0,71	
5	Ileu . Arg . Gly	0,10-0,12	+ 1,2
6	Arg . Asp (NH ₂) . Arg	0	+ 1,1
7	Lys . Val . Phe . Gly . Arg	0,05	+ 1,1
8	(Gly, Cys, Asp, Asp) . Arg . Thr . Pro . Gly . Ser . Arg . Asp (NH ₂) . Leu . Asp (NH ₂) . (Ser, Cys, Ileu, Pro) . Ala . Leu . Leu . Ser . Ser . (Ser, Asp (NH ₂), Ileu, Thr, Ala) . Asp (NH ₂) . Val . Cys . Cys . Ala . Lys . Lys . Ileu . Val . (Gly, Gly, Ser, Asp, Asp) . Met . Asp (NH ₂) . Ala . Try *	0	+ 0,2
9	Arg . Asp (NH ₂) . Arg . Cys . Lys . Gly . (Ser, Thr, Asp) . Val . Glu (NH ₂) . Ala . Try *	0	+ 0,2

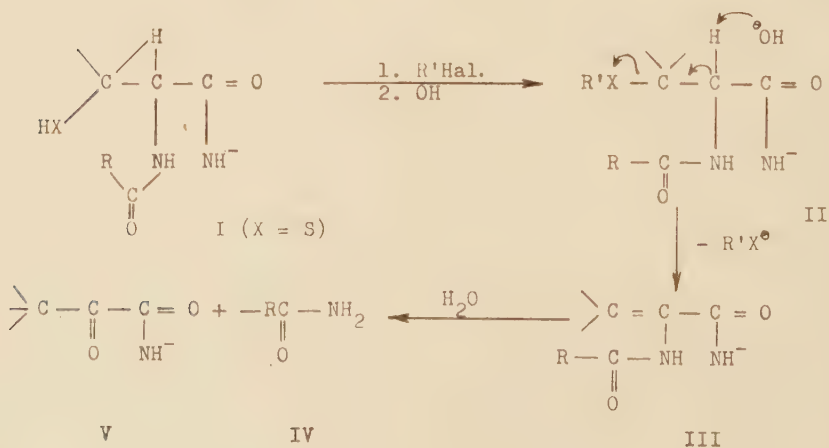
Dans le *Tableau XI* sont réunis tous les peptides que nous avons pu isoler par les différentes méthodes de séparation utilisées au cours de ces essais, mais ces résultats appellent des commentaires supplémentaires. Il est d'abord utile de rappeler que seul, le tripeptide Val . Ala . Try *, provenant d'une coupure spécifique du NBS au niveau des résidus de tryptophane, a pu être obtenu avec un rendement satisfaisant (15 à 22 %). Les deux derniers peptides (8 et 9 du *Tableau XI*) sont également formés après coupure spécifique de la chaîne polypeptidique, mais nous n'avons pas pu les séparer l'un de l'autre (comme il ressort du *Tableau XI*, ils ont les mêmes R_f et les mêmes mobilités). Nous avons admis la présence de ces deux unités peptidiques après hydrolyse totale et analyse par autoanalyseur, car la somme des acides aminés déterminés correspondait à leur composition respective. Ceci ne constitue, toutefois, pas une preuve. C'est là, en effet, une des difficultés qui apparaissent lorsqu'on se trouve en présence d'un mélange de peptides relativement longs, de poids

moléculaire voisin et avec les mêmes constantes. De plus, dans les meilleures conditions, on ne peut s'attendre qu'à 20 à 40 % de coupures spécifiques (fait établi par la mise en évidence, par dinitro-phénylation, des nouveaux acides aminés N-terminaux formés). Il reste donc dans le milieu une grande partie de la molécule de protéine, non attaquée ou partiellement oxydée, ce qui augmente encore la difficulté de séparation. Et c'est finalement là, qu'il faut chercher l'échec partiel de nos essais d'isoler les produits de la dégradation spécifique de la protéine.

Nous avons pu caractériser, par contre, malgré leur très faible rendement, d'autres fragments peptidiques provenant, en partie, de coupures non spécifiques. Ceci a été possible grâce à leurs constantes : soit que leur R_f était élevé, soit que leur mobilité les distinguait facilement des autres constituants (voir *Tableau XI*).

Le peptide 2 présente à son extrémité N-terminale une coupure au niveau d'un résidu de tyrosine. Il est connu que le NBS scinde aussi les liaisons peptidiques impliquant le groupement carboxylique d'un résidu de tyrosine, quoique la liaison peptidique au niveau des résidus de tryptophane soit plus sensible à son action. On a d'ailleurs proposé dans ce but d'acétyler préalablement les groupements hydroxyles du noyau phénol de la tyrosine, ce qui supprime la coupure spécifique à ce niveau par empêchement stérique. L'apparition avec un très faible rendement de ce peptide n'est donc pas étonnante et pouvait même être prévue.

Une autre observation, par contre, nous a beaucoup intrigués. Nous avons, en effet, caractérisé 4 peptides (correspondant aux n^{os} 3, 5, 6 et 7 dans le *Tableau XI*) présentant chacun une coupure au



niveau d'un résidu d'acide cystéique. Nous ne pouvons proposer aucune explication valable pour ce phénomène. Mais il est possible que les travaux de PATCHORNIK et al. [88], relatifs aux coupures préférentielles par formation de déshydropeptides, fournissent finalement une solution. PATCHORNIK et al. ont observé que cette coupure préférentielle avait lieu au niveau des résidus de cystéine dont le groupe $-SH$, d'abord transformé en un dérivé halogéné, est ensuite enlevé par β -élimination, ce qui mène à la formation d'un résidu de déshydroalanine. Une hydrolyse douce de ce déshydropeptide provoque la scission de la chaîne peptidique au niveau du résidu de déshydroalanine, par coupure préférentielle [53].

IV. — MODIFICATION DU SPECTRE ULTRAVIOLET DU LYSOZYME APRES ACTION DU NBS

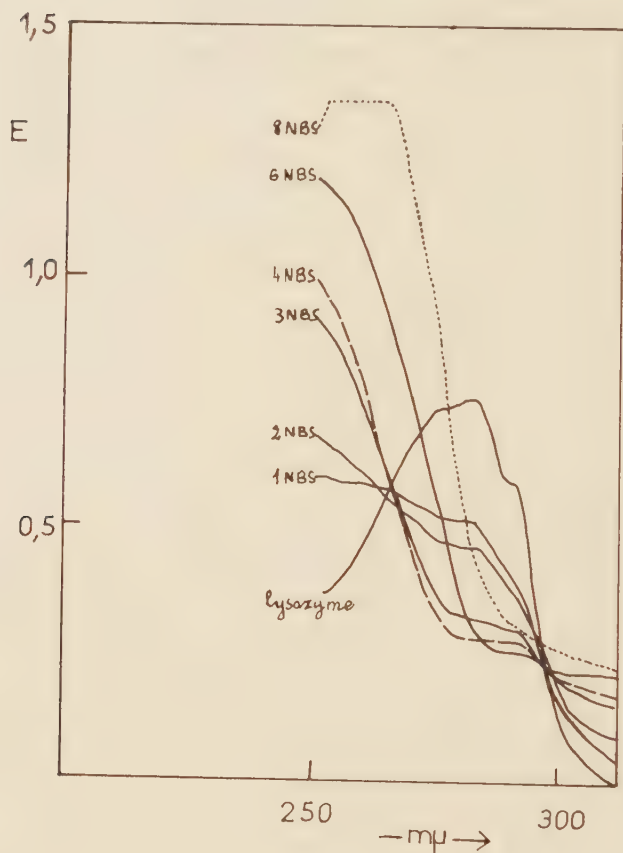
Le spectre ultraviolet du lysozyme, protéine riche en tryptophane, est caractérisé par les maxima dus à son spectre indole, avec une absorption maximum à $280\text{ m}\mu$; un deuxième pic à $290\text{ m}\mu$ est dû à la présence de tyrosine.

En suivant au spectrophotomètre l'action du NBS sur les résidus de tryptophane du lysozyme, il est possible de suivre graduellement la disparition du spectre de l'indole. PATCHORNIK et al. [46] ont proposé d'utiliser cet effet du NBS sur le spectre indole des protéines pour « titrer » leur teneur en tryptophane. En multipliant la baisse de la densité optique à $280\text{ m}\mu$ par un facteur empirique (1,31), on obtient, en effet, l'extinction due aux résidus de tryptophane dans les protéines (en admettant un coefficient d'extinction molaire de 5,500 pour le tryptophane).

La validité de cette méthode a pu être vérifiée avec les protéines suivantes : la protéine du virus de la mosaïque du tabac [48], l'albumine du sérum de bœuf [48, 49], l'albumine du sérum humain [48, 49], le lysozyme [48], l'hémoglobine A [48], la trypsine et le tryptsinogène [89], la chymotrypsine [90] et la créatinephosphokinase [58]. A l'instant où l'absorption à $280\text{ m}\mu$ atteint son minimum, tous les résidus de tryptophane ont subi une oxydation par le NBS, mais aucune coupure ne s'est encore produite.

Pour établir nos spectres ultraviolets du lysozyme après action de quantités croissantes de NBS, nous avons fait la lecture au spectrophotomètre Beckman en présence de 3 ml d'acide acétique 6 %, sur des échantillons de 1 mg de lysozyme, traité par 1, 2, 3, 4, 6 et 8 moles de NBS/mole de tryptophane.

Figure 12 : Modification du spectre ultraviolet du lysozyme après action du NBS (dans l'acide acétique 6 %)

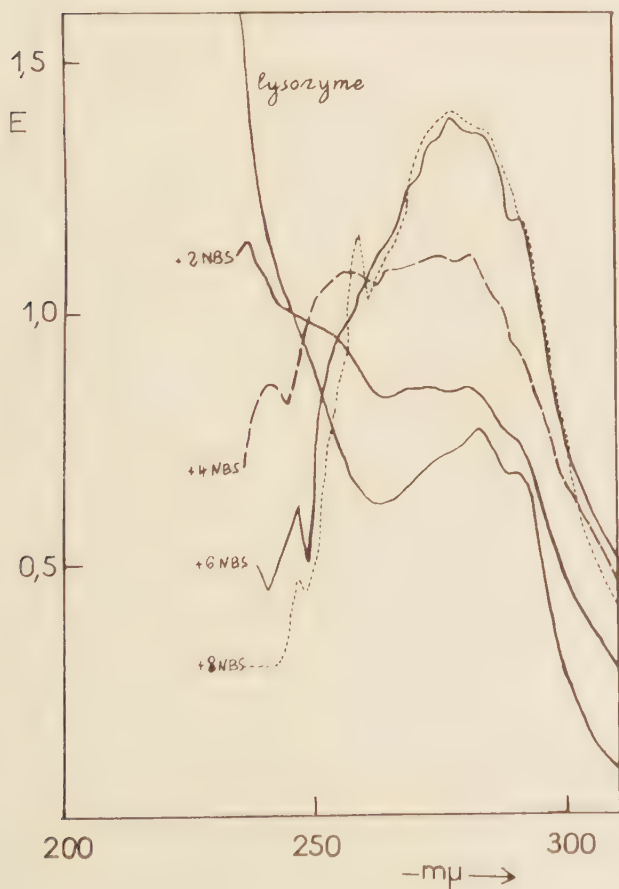


Il ressort de la *figure 12* qu'il y a une baisse de l'absorption à 280 mμ dès l'addition de 1 mole de NBS/mole de tryptophane. La baisse maximum de la densité optique à 280 mμ permet de calculer, d'après la méthode de PATCHORNIK et al. [46], que le lysozyme contient 6,5 résidus de tryptophane.

Il est difficile d'expliquer la nouvelle augmentation de l'absorption à 280 mμ, après passage par un minimum. Ceci est probablement dû à des produits de dégradation, apparaissant après une oxydation plus poussée, et peut-être à une énoisation de la lactone. En outre,

ce phénomène de la variation de l'absorption à $280\text{ m}\mu$ dépend fortement du solvant utilisé pour faire les mesures. Ainsi, par exemple, le même échantillon de lysozyme ayant servi pour établir les spectres ultraviolets représentés par la *figure 12* ne montre aucune baisse d'absorption à $280\text{ m}\mu$ en présence de quantités croissantes de NBS, si la lecture est faite en dissolvant l'échantillon dans 3 ml de NaOH, 0,1 N.

Figure 13 : Modification du spectre ultraviolet du lysozyme après action du NBS (dans NaOH 0,1 N)



V. — REPERCUSSION DE L'ACTION DU NBS SUR L'ACTIVITE LYSANTE DU LYSOZYME

L'activité lysante a été déterminée par turbidimétrie [69], en mesurant l'augmentation de la transmission d'une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* après addition de différents échantillons de lysozyme traité par des quantités croissantes de NBS.

TABLEAU XII
*Modification de l'activité lysante du lysozyme
après action du NBS*

Moles de NBS/ mole de tryptophane	Activité lysante résiduelle (%)
0	100
1	25
2	5
3	0
6	0

L'activité lysante du lysozyme est donc rapidement altérée sous l'action du NBS. Avec 2 moles de NBS/mole de tryptophane, il ne reste plus que 5 % de l'activité lysante.

L'importance des résidus de tryptophane intacts dans l'activité du lysozyme avait déjà été mise en évidence par L. WEIL et al. [91], qui ont observé que la photooxydation de l'enzyme, en présence de bleu de méthylène, amenait une perte complète de l'activité. D. SHUGAR [92] a ensuite constaté que l'addition de tryptophane libre au mélange réactionnel avait un effet protecteur sur l'activité enzymatique au cours de la photooxydation.

En utilisant le NBS pour l'oxydation des résidus de tryptophane du lysozyme, RAO et al. [93] ont pu observer une baisse de l'activité lysante de l'enzyme (96 % d'inactivation en oxydant le lysozyme avec environ 11 moles de NBS/mole de lysozyme), qui correspond parfaitement à nos propres résultats, publiés antérieurement.

VI. — REPERCUSSION DE L'ACTION DU NBS SUR LES ACIDES AMINES AUTRES QUE LE TRYPTOPHANE

Au cours de l'étude de l'action du NBS sur la chymotrypsine [90], dans des conditions ne provoquant que la seule oxydation des résidus de tryptophane, sans coupure spécifique, on a observé qu'un résidu

de tyrosine avait également été oxydé; ceci a été vérifié avec un hydrolysats total de l'échantillon, où l'on ne pouvait plus mettre en évidence le troisième résidu de tyrosine de la protéine.

Il nous a paru intéressant de voir la répercussion de l'action du NBS sur les acides aminés du lysozyme autres que le tryptophane dans les conditions d'oxydation que nous avons adoptées pour nos expériences.

10 mg de lysozyme ont été traités par 6 moles de NBS/mole de tryptophane, en présence d'acide acétique à 60 %. L'échantillon a ensuite subi une oxydation par l'acide performique. Après hydrolyse totale (HCl, 5,7 N, 110°, 20 heures) de 3 mg de la préparation, l'analyse de la composition en acides aminés a été effectuée en utilisant l'autoanalyseur.

Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec un lysozyme natif et un lysozyme oxydé par l'acide performique et traité ensuite par le brome.

TABLEAU XIII

*Composition en acides aminés du lysozyme natif,
du lysozyme oxydé et bromuré et du lysozyme traité par le NBS*

Acides aminés	Nombre de résidus trouvés			Nombre de résidus théoriques
	Lysozyme natif	Lysozyme oxydé et bromuré	Lysozyme traité par le NBS et oxydé	
Cys-SO ₃ H	0	6,7	2,9	8
Asp	20	20,6	19,7	23
Met-O ₂	0	1,5	1,5	2
Thr	7,5	5,1	6,6	7
Ser	10,4	9,4	7,9	11
Glu	4,8	4,8	5,3	5
Pro	1,4	2,1	2,2	2
Gly	12,7	12,2	14,2	12
Ala	12,0	12,0	11,6	12
(Cys-)	7,9	0	0	
Val	5,1	5,2	5,4	6
Met	0,45	0	0	0
Ileu	5,2	5,3	5,3	6
Leu	8,1	7,8	9,1	8
Tyr	3,05	0	0	3
Phe	3,05	2,9	3,0	3
Lys	5,5	5,5	6,0	6
His	1,0	0,3	?	1
Arg	10,5	10,5	10,2	11

Il ressort de l'examen du *Tableau XIII* que les résidus de tyrosine ont été complètement détruits au cours du traitement du lysozyme par le NBS (il est intéressant de noter qu'un traitement par le brome d'un lysozyme oxydé provoque les mêmes effets sur les résidus de tyrosine). Un autre acide aminé a également été touché par l'action du NBS. C'est l'acide cystéique. Contrairement à ce que nous avons observé avec la tyrosine, le traitement du lysozyme oxydé par le brome n'a pas eu de répercussions significatives sur l'acide cystéique. Si, par contre, le lysozyme est d'abord soumis à un traitement par le NBS, et ensuite à une oxydation par l'acide performique, il y a une destruction importante de l'acide cystéique. Cette observation est très intéressante et explique peut-être l'apparition de coupures au niveau des résidus d'acide cystéique que nous avons signalées précédemment. De plus, le fait que cette disparition de l'acide cystéique ne soit significative que dans le cas où le lysozyme a d'abord été traité par le NBS et ensuite seulement par l'acide performique, semble confirmer notre hypothèse, exposée plus haut, qu'il s'agit peut-être d'une hydrolyse préférentielle d'un déshydropeptide (après élimination du groupement β -mercapto de la cystéine), phénomène observé et étudié par PATCHORNIK et al. [88] sur des substrats synthétiques et des peptides au cours de la coupure spécifique au niveau des résidus de cystéine.

La destruction partielle de la sérine et de l'acide aspartique s'explique aisément par l'action d'un agent fortement oxydant.

Un seul acide aminé a été trouvé en excès de façon significative. C'est le glyocolle. Nous avons déjà observé ce phénomène en analysant les peptides provenant de coupures spécifiques après les résidus de tryptophane. Il est très probable qu'au cours de la dégradation ultérieure, le dérivé oxydé du tryptophane soit scindé en une molécule de glyocolle et un autre dérivé cyclique. Si nous ne trouvons pas davantage de glyocolle (si la réaction était quantitative, nous devrions trouver 6 résidus supplémentaires de glyocolle, provenant des 6 résidus de tryptophane modifié), ceci s'explique par le fait qu'un excès de NBS dans le milieu réactionnel détruit le glyocolle [47].

CHAPITRE II

APPLICATION A LA CASEINE KAPPA

I. — DONNEES GENERALES SUR LA CASEINE KAPPA [94]

La caséine kappa est une glycoprotéine [95] contenant une partie peptidique (81 %) et une partie glucidique (6 %). Elle contient également de l'acide phosphorique. Il reste une partie indosée comme dans beaucoup d'autres glycoprotéines connues. Le poids moléculaire doit être proche de 30.000. Elle constitue, en outre, le substrat spécifique de la présure.

La caséine kappa est obtenue à partir de la caséine du lait, dont on sait qu'elle n'est pas homogène (caséine α , β et γ). La caséine α peut être fractionnée en plusieurs constituants, dont le plus intéressant est la caséine kappa [96]. Elle a des propriétés stabilisantes pour les autres constituants et empêche leur précipitation par le calcium. La caséine kappa présente environ 15 % du poids de la caséine entière.

La caséine kappa a pu être obtenue à un degré de pureté très élevé [94] et sa composition en acides aminés a été établie [95]. La détermination du tryptophane par la technique de SPIES et CHAMBERS [97] indiquait la présence de 2 résidus de cet acide aminé.

L'étude de la structure primaire de la caséine kappa est encore à ses débuts.

Grâce à la spécificité du NBS de couper la liaison peptidique entre le groupement carboxylique du tryptophane et l'acide aminé impliqué dans la même liaison par son groupement aminé, nous avons la possibilité de déterminer, après dinitrophénylation des nouveaux résidus N-terminaux apparus, les enchaînements tryptophane-acide aminé de la caséine kappa.

II. — LES NOUVEAUX RESIDUS N-TERMINAUX APPARUS APRES ACTION DU NBS

En faisant agir 6 moles de NBS, mole de tryptophane de la caséine kappa, en solution à 1 % dans l'acide acétique, nous pouvons nous attendre à des coupures spécifiques libérant de nouveaux groupements N-terminaux : ceux-ci pouvaient ensuite être caractérisés par dinitrophénylation.

100 mg de caséine kappa ont été traités par 9 mg de NBS, en présence d'acide acétique à 60 %. La préparation, amenée à sec, a ensuite été reprise par 10 ml d'eau et le pH de la solution a été porté à 8 par addition de triméthylamine à 25 %. 25 mg de FDNB, dissous dans 1 ml d'alcool éthylique, ont été ajoutés et la dinitrophénylation a été poursuivie pendant 4 heures à 20°, sur un agitateur magnétique, à l'obscurité. En acidifiant le mélange réactionnel (pH 4), nous avons obtenu un précipité qui a été lavé à l'éther (97 mg).

Après hydrolyse acide (2 heures, 110°, HCl 10,7 N) de parties aliquotes du précipité, les hydrolysats ont été dilués par l'eau et extraits à l'éther. Une phase acidosoluble et une phase éthérosoluble ont ainsi été obtenues.

La chromatographie des acides aminés acidosolubles dans le solvant A, nous indiquait qu'il n'y avait que la ϵ -DNP-lysine dans la phase acidosoluble.

La chromatographie des acides aminés éthérosolubles dans le solvant B faisait apparaître une forte tache au niveau DNP-Asp-DNP-Glu. Pour déterminer duquel de ces deux aminoacides il s'agit, nous avons élué la tache de ce premier chromatogramme par le mélange acétone : HCl N et nous l'avons rechromatographiée dans le solvant C. D'après les points témoins, il semblait bien s'agir de DNP-Glu, mais la séparation n'était pas encore suffisamment claire. D'autre part, nous avons observé une tache au niveau de DNP-Ser, dans le solvant B. Pour déterminer s'il s'agit bien de ce DNP-aminoacide et non du dinitrophénol qui a le même R_f dans le solvant B, il faudra utiliser un autre moyen de séparation, par chromatographie dans un autre solvant.

C'est pourquoi nous avons eu recours à la chromatographie bidimensionnelle sur papier, décrite par PAIRENT et WILLIAMSON [68], qui permet de mieux séparer DNP-Asp et DNP-Glu. Elle permet, aussi, de séparer nettement DNP-Ser et dinitrophénol, qui ont le même R_f dans le solvant B.

Nous avons également fait une détermination quantitative des DNP-aminoacides (DNP-Ser et DNP-Glu), élués après chromatographie dans les solvants D(1) et D(2), par lecture au spectrophotomètre à 360 m μ . La moyenne de 6 déterminations quantitatives, après hydrolyse acide de 2 heures (110°, HCl 10,7 N) et passage dans différents solvants [B et D(1)/D(2)], nous a permis de caractériser le DNP-Glu avec un rendement de 18 % et le DNP-Ser avec un rendement de 12 %.

Une hydrolyse prolongée (5 heures) de la préparation dinitro-phénylée faisait apparaître, après chromatographie dans les 2 solvants D, des traces de DNP-Val, DNP-Asp, DNP-Thr et DNP-Ala. D'autre part le rendement en DNP-Glu avait augmenté, mais il y avait moins de DNP-Ser. L'apparition de ces nouveaux résidus nous indique qu'il y a également eu quelques coupures non spécifiques, sans doute après les résidus de tyrosine ; ceci ne surprend pas lorsque l'on sait que la caséine kappa est riche en tyrosine (13 résidus).

L'ensemble de nos résultats nous permet de penser qu'il y a dans la molécule de caséine kappa les enchaînements Try-Glu et Try-Ser.

L'étude de la structure chimique de la caséine kappa est actuellement commencée et permettra, ultérieurement, de vérifier nos résultats.

CHAPITRE III

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PRODUITS DE DEGRADATION DU TRYPTOPHANE FORMES PAR ACTION DU N-BROMOSUCCINIMIDE

Dans le but d'une étude des produits de dégradation du tryptophane que nous obtenons dans les conditions utilisées pour nos expériences, nous avons fait réagir le tryptophane avec 1, 2, 3, 4, 6 et 8 NBS (rapports molaires), en présence d'acide acétique 60 %.

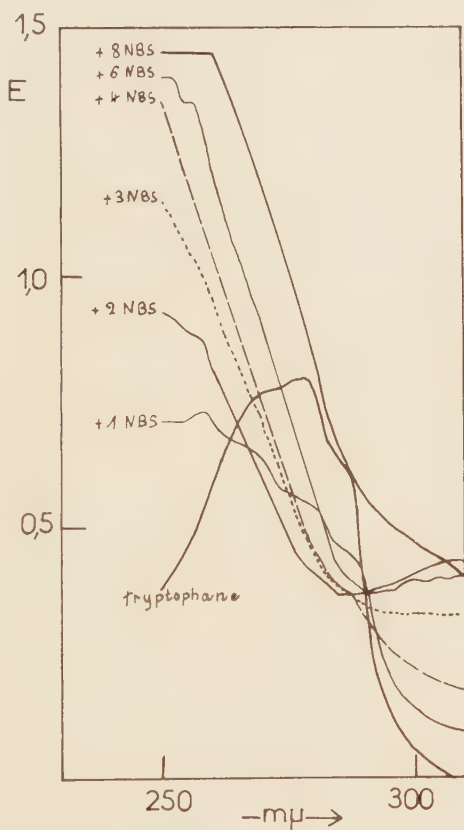
Pour pouvoir comparer les spectres ultraviolets de ces dérivés avec ceux que nous avons obtenus avec 1 mg de lysozyme traité par des quantités croissantes de NBS (voir *fig. 12*), nous avons fait réagir 0,414 μ M de tryptophane (= quantité de tryptophane dans 1 mg de lysozyme) avec le NBS.

De la comparaison des *figures 12* et *14* il ressort, en effet, que la modification du spectre ultraviolet du lysozyme, après action du NBS, est caractérisée, essentiellement, par la modification du spectre indole.

Nous avons voulu caractériser les produits de dégradation du tryptophane également par leur R_f au cours de chromatographies dans le solvant A. Il en résultait, après révélation à la ninhydrine : 1) que les produits principaux de dégradation du tryptophane présentent le même R_f (0,50) que le tryptophane lui-même dans le solvant A, et 2) qu'après réaction entre le tryptophane et le NBS en quantités équimoléculaires, le tryptophane n'est pas complètement dégradé (il faut 1,53 moles de NBS/mole de tryptophane, d'après PATCHORNIK et al. [46] pour une transformation complète), ce qui est mis en évidence par la réaction d'Ehrlich, sur papier. Avec 2 moles de NBS/mole de tryptophane la réaction d'Ehrlich donne une coloration jaune-orange (au lieu de la coloration bleue caractéristique du noyau

indole), pour tourner franchement au vert avec les produits de dégradation provenant de la réaction du tryptophane avec 4 et 6 moles de NBS.

Figure 14 : Modification du spectre ultraviolet du tryptophane par action du NBS



La chromatographie dans les mêmes conditions, mais avec des produits ayant subi, après traitement par le NBS, une oxydation par l'acide performique, révèle la présence des mêmes produits de dégradation principaux. L'oxydation par l'acide performique ne semble donc pas modifier profondément la structure de ces dérivés.

La chromatographie des dérivés du tryptophane, tels que nous les obtenons au cours de nos expériences, dans l'autoanalyseur Technicon, donne lieu à l'apparition d'un pic, situé juste avant le pic ammoniac.

PATCHORNIK et al. [46] avaient pu déterminer la nature du dérivé oxydé du tryptophane, par action du NBS, comme étant une spirolactone, présentant un pic caractéristique dans l'ultraviolet aux environs de 260 m μ .

Si dans notre essai, représenté par la *figure 14*, nous ne voyons pas cette absorption à 260 m μ avec le tryptophane traité par des quantités équimoléculaires de NBS, ceci s'explique peut-être par la présence d'autres produits de dégradation qui forment des complexes avec la spirolactone.

Pour mettre en évidence la spirolactone seule, il était donc nécessaire de la séparer des autres substances gênantes.

Une filtration sur Sephadex G-25 des échantillons à étudier nous a permis de séparer le principal produit de dégradation du tryptophane résiduel, qui est caractérisé par son R_f dans le solvant A.

• CONDITIONS DE FILTRATION :

La colonne (20 $\times$ 1 cm) contient le gel en milieu aqueux. L'échantillon à analyser, préalablement amené à sec, est repris par 2 ml d'eau et chargé sur la colonne. L'élution se fait par l'eau. On recueille des fractions de 3 ml. Le dosage à la ninhydrine est fait sur des prises de 1 ml. Le composé avec un R_f de 0,50 est repéré par chromatographie sur papier Whatman n° 1, dans le solvant A, de fractions aliquotes des tubes ayant donné une réaction positive avec la ninhydrine. Les tubes contenant le dérivé du tryptophane sont réunis et le produit est amené à sec, au dessiccateur.

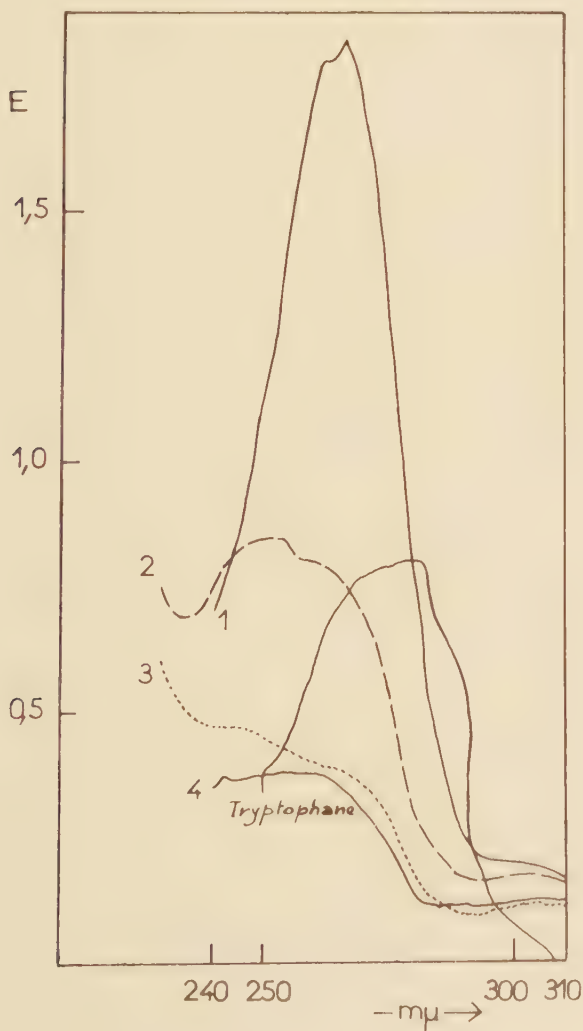
Nous avons préparé de cette façon les dérivés du tryptophane provenant des expériences suivantes :

- 1) 1 μ M de tryptophane + 1 mole NBS/mole Try + oxydation par l'acide performique ;
- 2) 1 μ M de tryptophane + 1 mole NBS/mole Try + oxydation par l'acide performique + hydrolyse totale ;
- 3) 1 μ M de tryptophane + 6 moles NBS/mole Try + oxydation par l'acide performique ;
- 4) Val-Ala-Try *, provenant d'une coupure spécifique du lysozyme au niveau d'un résidu de tryptophane par le NBS, obtenu à l'état pur par chromatographie préparative sur papier, correspond donc à :
tryptophane + 6 moles NBS/mole Try + oxydation par l'acide performique + hydrolyse totale.

Les spectres ultraviolets sont déterminés, en présence de 3 ml d'eau, dans un spectrophotomètre Beckman, modèle « DU ».

Dans l'échantillon où le tryptophane avait été traité par une quantité équimoléculaire de NBS, nous avons pu mettre en évidence le pic caractéristique de la spirolactone à 260 m μ (fig. 15). Le spectre du dérivé du tryptophane traité par 6 NBS, par contre, ne montre plus de pic caractéristique. Il semble donc que la spirolactone ait subi une dégradation plus poussée avec l'excès d'oxydant. De même, le dérivé du tryptophane isolé à partir du peptide Val-Ala-Try * ne présente plus le pic caractéristique.

Figure 15 : Spectres ultraviolets des dérivés du tryptophane apparus après action du NBS (dérivés isolés à partir du mélange réactionnel par filtration sur Sephadex)



DISCUSSION DE L'UTILITE DE LA METHODE DANS L'ETUDE DE LA STRUCTURE DES PROTEINES ET CONCLUSIONS

A la fin de ce travail s'impose la discussion, à la lumière de nos résultats, de l'utilité de la méthode proposée par PATCHORNIK et al. [46] pour la coupure chimique spécifique d'une protéine.

L'emploi du NBS pour la détermination des enchaînements « tryptophane-acide aminé » au sein d'une molécule de protéine, par la coupure spécifique de cette liaison, nous semble, d'après nos résultats et ceux de nombreux autres chercheurs un moyen rapide et efficace dans l'étude de la structure des protéines. Bien que nous ayons vu que l'action du NBS sur le lysozyme provoquait également des coupures non spécifiques, celles-ci sont obtenues avec un rendement beaucoup plus faible. La coupure de la liaison tryptophane-acide aminé est toujours préférentielle. Il est d'ailleurs possible d'empêcher les coupures non spécifiques au niveau des résidus de tyrosine, par acétylation.

L'emploi du NBS pour la détermination du nombre de résidus de tryptophane d'une protéine, par mesure de la baisse de la densité optique à 280 m μ , est également très précieux ; il permet d'avoir rapidement des indications utiles. De même, pour la détermination du rôle des résidus de tryptophane dans l'activité d'une protéine, le NBS peut encore rendre des services importants.

Par contre, si l'on désire utiliser le NBS pour la coupure spécifique des protéines dans le but d'une étude de leur structure primaire, c'est-à-dire pour obtenir des enchaînements peptidiques dont le résidu C-terminal est constitué par un dérivé du tryptophane, l'utilité de la méthode est très discutable. Dans le cas de courts peptides, ce moyen de scission et la séparation ultérieure des séquences obtenues est très valable, comme l'indiquent les travaux de PATCHORNIK et al. [45, 47, 48] sur le glucagon. Par contre, PETERS [49] n'a pas pu

séparer les séquences obtenues après action du NBS sur la sérumalbumine bovine (P.M. 70.000 ; 2 résidus de tryptophane), quoiqu'il ait pu établir préalablement, que deux coupures s'étaient réellement faites. Il essaye d'expliquer cet échec en supposant que les fragments de la chaîne sont encore liés par des liaisons secondaires. Le même échec dans la séparation des nouveaux peptides formés après action du NBS a été signalé par ANDERER et al. [53] dans le cas de la protéine du virus de la mosaïque du tabac.

Les résultats de nos expériences sur le lysozyme suggèrent une autre solution pour expliquer cette difficulté de séparer les séquences après action du NBS sur une protéine de haut poids moléculaire. Nous avons toujours pu isoler et caractériser, après action du NBS sur le lysozyme, le tripeptide Val-Ala-Try *. Ce fait semble donc parler contre la présence de liaisons secondaires ou tertiaires entre les fragments. La seule raison pour laquelle nous avons toujours obtenu cet enchaînement avec un bon rendement au cours de nos essais de séparation est, qu'il s'agit là d'un très court peptide, séparé facilement des longs enchaînements grâce à son R_f dans le solvant A, ou grâce à son petit poids moléculaire lors de la filtration sur Sephadex.

Dans le cas du lysozyme, tous les autres fragments obtenus après action du NBS (excepté l'enchaînement C-terminal) doivent avoir un R_f égal à zéro, dans le solvant A, et sont très difficiles à séparer sur une colonne d'échangeurs d'ions et par filtration, en raison de leur poids moléculaire voisin et de leur charge électrique.

D'autre part, la nécessité d'utiliser un certain excès de NBS, afin d'assurer la coupure de la chaîne polypeptidique au niveau des résidus de tryptophane avec un bon rendement, favorise les coupures non spécifiques qui donnent ainsi naissance à des fragments supplémentaires, avec un faible rendement certes, mais qui compliquent considérablement la séparation et la purification des peptides obtenus grâce à des coupures spécifiques.

En définitive, l'emploi du NBS peut être très utile pour l'étude de la structure primaire de courts peptides. Dans le cas des protéines on peut proposer son emploi, non pour étudier la protéine entière, mais par exemple, pour une séquence de faible poids moléculaire, qui en provient, au sein de laquelle se trouve un résidu de tryptophane. De cette manière on pourra facilement obtenir une coupure spécifique et séparer ensuite les deux nouvelles séquences d'acides aminés formées. Dans cette optique, le NBS peut rendre les mêmes services dans l'étude de la structure primaire des protéines que les enzymes protéolytiques spécifiques.

RESUME

Le présent travail est une contribution à l'étude de la structure chimique des protéines.

Dans une première partie nous avons pu démontrer que l'acétylation d'une protéine (nous avons choisi le lysozyme de blanc d'œuf de poule pour ces expériences) permet de transformer les groupements ϵ -aminés de la lysine en résidus d'acétyllysine qui, par empêchement stérique, s'opposent à l'action enzymatique de la trypsine. De cette façon, il a été possible de couper spécifiquement la protéine acétylée au niveau des seuls résidus d'arginine, ce qui a donné naissance à des peptides dont l'acide aminé C-terminal a toujours été représenté par l'arginine, et à la leucine libre (acide aminé C-terminal du lysozyme).

L'intérêt de posséder une méthode permettant de couper une protéine en un nombre restreint de peptides s'est fait sentir au cours de ces dernières années, depuis que les chercheurs s'attaquent à des protéines d'un poids moléculaire supérieur à 15.000. Dans ce cas, l'utilisation des seules méthodes classiques fournit toujours, après hydrolyse enzymatique, un très grand nombre de séquences à partir desquelles il est très difficile, sinon impossible, de reconstituer leur enchaînement primitif au sein de la molécule de protéine.

Au cours de notre travail, nous avons pu démontrer la validité de notre méthode en isolant et caractérisant tous les peptides obtenus après hydrolyse trypsique du lysozyme acétylé. Par cette méthode, il a été possible non seulement de vérifier par un autre moyen d'investigation la structure primaire du lysozyme, mais également de localiser le dipeptide Cys-Lys dans l'enchaînement de la protéine.

Nous avons donc pu démontrer que la modification chimique des protéines par acétylation constitue un procédé valable pour obtenir une dégradation spécifique ultérieure par la trypsine, donnant ainsi naissance à des séquences prolongées, ce qui facilite considérablement l'établissement de la structure primaire d'une protéine de poids moléculaire élevé. De plus, c'est la première fois que l'on a vérifié par

séparation et caractérisation de toutes les unités tryptiques de la protéine chimiquement modifiée, la validité de telles méthodes dans l'établissement de la structure primaire d'une protéine.

A côté des enzymes protéolytiques, on a suggéré l'emploi de peptidases « chimiques », telles que le N-bromosuccinimide, qui hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant le groupement carboxylique des résidus de tryptophane.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié en prenant comme exemples le lysozyme et la caséine kappa, la validité de cette méthode pour l'étude de la structure des protéines.

Les résultats de nos expériences ont permis de démontrer que l'emploi du N-bromosuccinimide constitue un moyen rapide et efficace pour la détermination des enchaînements « tryptophane-acide aminé » au sein d'une molécule de protéine, par la coupure spécifique de cette liaison, suivie de la mise en évidence des nouveaux résidus N-terminaux ainsi formés par dinitrophénylation. D'autre part, le N-bromosuccinimide peut être utilisé avec succès pour la détermination du nombre de résidus de tryptophane d'une protéine par mesure de la baisse de la densité optique à 280 m μ . Par contre, son emploi est très discutable pour la coupure spécifique des protéines dans le but d'une étude de leur structure primaire. D'une part, on observe avec un faible rendement, des coupures non spécifiques, au niveau des résidus de tyrosine et de demi-cystine. D'autre part, l'action du N-bromosuccinimide provoque la formation de longues séquences de poids moléculaire très voisin qui sont difficiles à séparer. Dans le cas du lysozyme, nous avons pu trouver, malgré leur faible rendement, mais grâce à leurs constantes caractéristiques quelques peptides provenant de coupures non spécifiques. Par contre, un seul peptide provenant d'une coupure spécifique a pu être obtenu avec un bon rendement. Il s'agit du tripeptide Val-Ala-Try. Ce fait semble s'opposer à l'hypothèse selon laquelle la séparation des séquences serait impossible en raison de liaisons secondaires existant encore entre les différents fragments obtenus après action du N-bromosuccinimide sur les protéines.

Dans le cas de la caséine kappa, l'emploi du N-bromosuccinimide nous a permis de déterminer, pour la première fois, les deux acides aminés impliqués par leur groupement aminé dans la liaison avec le tryptophane. Il s'agit des enchaînements Try-Glu et Try-Ser.

Nous avons conclu que l'emploi du N-bromosuccinimide pour l'étude de la structure chimique peut être très utile pour les peptides et protéines de faible poids moléculaire où les séquences obtenues après action du N-bromosuccinimide sont courtes et faciles à séparer.

Dans le cas des protéines de poids moléculaire élevé, on peut proposer son emploi, non pour la protéine entière, mais par exemple pour une séquence de faible poids moléculaire qui en provient et au sein de laquelle se trouve un résidu de tryptophane. De cette manière on pourra facilement obtenir une coupure spécifique, et séparer ensuite les deux nouvelles séquences d'acides aminés formées. Dans cette optique, le N-bromosuccinimide peut rendre les mêmes services pour l'étude de la structure primaire des protéines que les enzymes protéolytiques spécifiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 SANGER (F.). — The arrangement of aminoacids in proteins. *Advances Protein Chemistry*, 7 (1952) 1.
- 2 BERGMAN (M.) et FRUTON (J.S.). — *Advances in Enzymology*, 1 (1941) 63.
- 3 GREEN (N.M.) et NEURATH (H.). — The proteolytic enzymes. *The Proteins*, vol. II B, Academic Press, New York, 1954, p. 1127.
- 4 WHITE (W.F.) et GROSS (A.M.). — Studies on adrenocorticotropin. XIV. Action of bovine fibrinolysin and of liver cathepsin on corticotropin A : effect on biological activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 1141.
- 5 GREENBERG (D.M.) et WINNICK (Th.). — Enzymes that hydrolyze the carbon-nitrogen bond : proteinases, peptidases and amidases. *Ann. Rev. Biochem.*, 14 (1945) 31.
- 6 MASCHMANN (E.). — *Ergebn. Enzymforsch.*, 9 (1943) 155.
- 6a. LABOUESSE (B.). — Isolement et étude de quelques propriétés de la protéase activable par la cystéine de *Clostridium histolyticum*. Thèse de Doctorat ès Sciences, Paris, 1961.
- 7 HENRIGUES (O.B.), FICHMAN (M.) et HENRIGUES (S.B.). — Partial purification and some properties of blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem. J.*, 75 (1960) 551.
- 8 SANGER (F.) et THOMPSON (E.O.P.). — The aminoacid sequence in the glyceryl chain of insulin. *Biochem. J.*, 53 (1953) 353, 366.
- 9 BELL (P.H.). — Purification and structure of β -corticotropin. *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 5565.
- 10 HIRS (C.H.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — The sequence of the amino-acid residues in performic acid oxidized ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 633.
- 11 SPACKMAN (D.M.), STEIN (W.H.) et MOORE (S.). — The disulfide bonds of ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 648.
- 12 ANDERER (F.A.), UHLIG (H.), WEBER (E.) et SCHRAMM (G.). — Primary structure of the protein of tobacco mosaic virus. *Nature*, 186 (1960) 922.

13. TSUGITA (A.), GISH (D.T.), YOUNG (J.), FRAENKEL-CONRAT (H.), KNIGHT (C.A.) et STANDLEY (W.M.). — *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 46 (1960) 1463.
14. JOLLÈS (J.) et JOLLÈS (P.). — Structure chimique du lysozyme de blanc d'œuf de poule : la formule développée. *C.R. Acad. Sci.*, 253 (1961) 2773.
15. BRAUNITZER (G.), GEHRING-MULLER (R.), HILSCHMANN (N.), HILSE (K.), HOBOM (G.), RUDLOFF (V.) et WITTMANN-LIEBOLD (B.). — Die Konstitution des normalen adulten Humanhämoglobins. *Z. Physiol. Chem.*, 325 (1961) 283.
16. KONIGSBERG (W.) et HILL (R.J.). — The structure of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 2547.
17. ANSON (M.L.). — Les protéines. IX^e Conseil de Chimie tenu à l'Université de Bruxelles, 1953, p. 149, R. Stoops ed., Bruxelles.
18. PUTMAN (F.W.). — The proteins. Academic Press, New York, 1953.
19. SANGER (F.). — The free amino groups of insulin. *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
20. ANFINSEN (Ch. B.), SELA (M.) et TRITCH (H.). — A method for the specific proteolytic cleavage of protein chains. *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 156.
21. REDFIELD (R.R.) et ANFINSEN (Ch. B.). — The structure of ribonuclease II. The preparation, separation and relative alignment of large enzymatically produced fragments. *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 385.
22. HOLLEMAN (J.W.) et BIZERTE (J.). — Données nouvelles sur la structure de la myoglobine de cheval. *Biochim. Biophys. Acta*, 33 (1959) 143.
23. HOFMANN (K.) et BERGMANN (M.). — The specificity of trypsin. *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 81.
24. PHILPOT (J. St L.) et SMAIL (P.A.). — The action of nitrous acid on pepsin. *Biochem. J.*, 32 (1938) 542.
25. HABEEB (A.F.S.A.). — A new reagent for the guanidination of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 294.
26. HABEEB (A.F.S.A.). — A new reagent for the guanidination of proteins. *Canad. J. of Biochem. and Physiol.*, 38 (1960) 493.
27. FRAENKEL-CONRAT (H.). — Aminoacids and proteins. Greenberg D.M. ed., chapitre IX, Thomas C.C. Springfield, Ill., 1951.
28. LI (Ch. H.) et BERTSCH (L.). — Adrenocorticotropins XX Succinyl-adrenocorticotropin and its hydrolysis by trypsin. *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 2638.
29. HABEEB (A.F.S.A.), CASSIDY (H.G.) et SINGER (J.). — Molecular structural effects produced in proteins by reaction with succinic anhydride. *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 587.

30. WEIL (L.) et TELKA (M.). — Tryptic digestion of native and chemically modified α -lactalbumine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 71 (1957) 473.
31. MERIGAN (T.C.), DREYER (W.J.) et BERGER (A.). — A technique for the specific cleavage of arginyl bonds by trypsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 62 (1962) 122.
32. DESNUELLE (P.) et CASAL (A.). — Sur la moindre résistance à l'hydrolyse acide des liaisons peptidiques situées à côté d'une fonction hydroxyle. *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 64.
33. DESNUELLE (P.) et BONJOUR (G.). — Nouvelles recherches sur l'hydrolyse préférentielle des liaisons sérine et thréonine dans les protéines. *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 451.
34. LUCAS (F.), SHAW (J.T.B.) et SMITH (S.G.). — The aminoacid sequence in a fraction of the fibroin of *Bombyx mozi*. *Biochem. J.*, 66 (1957) 468.
35. ANDO (T.), IWAI (K.), ISHII (S.), AZEGAMI (M.) et NAKAHANI (Ch.). — The chemical structure of one component of clupein. *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 628.
36. MUELLER (J.M.), PIERCE (J.G.) et VIGNEAUD (V. DU). — Treatment of performic acid oxidized oxytocin with bromine water. *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 857.
37. RESSLER (Ch.) et VIGNEAUD (V. DU). — Bromination of performic acid oxidized oxytocin. *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 809.
38. POPENOE (E.A.) et VIGNEAUD (V. DU). — Degradative studies on vasopressin and performic acid oxidized vasopressine. *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 133.
39. RESSLER (Ch.), TRIPPETT (St.) et VIGNEAUD (V. DU). — Free amino groups of performic acid oxidized oxytocin and of its cleavage products formed by treatment with bromine water. *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 861.
40. THOMPSON (E.O.P.). — Selective degradation by bromine water of polypeptide chains of oxidized insulin. *Australian J. Biol. Sci.*, 13 (1960) 106.
41. COREY (E.J.) et HAEFELE (L.F.). — Oxidative cleavage of amides. A method for selective chemical degradation of peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 2225.
42. LAWSON (W.B.), GROSS (E.), FOLTZ (C.M.) et WITKOP (B.). — Specific cleavage of methionyl peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 1509. Et GROSS (E.) et WITKOP (B.). — Selective cleavage of the methionyl peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide. *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 1510.
43. CHAPPELLE (E.W.) et LUCK (J.M.). — The decarboxylation of aminoacids, proteins and peptides by N-bromosuccinimide. *J. Biol. Chem.*, 229 (1957) 171.

44. SCHMIR (G.L.), COHEN (L.A.) et WITKOP (B.). — The oxidative cleavage of tyrosylpeptide bonds. *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 2228.
45. PATCHORNIK (A.), LAWSON (W.B.) et WITKOP (B.). — The use of neighbouring group effects for the selective cleavage of peptide bonds. I. The mechanism of oxidation of β -substituted indoles with N-bromosuccinimide. *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 4748.
46. PATCHORNIK (A.), LAWSON (B.) et WITKOP (B.). — Selective cleavage of peptide bonds. II. The tryptophyl peptide bond and the cleavage of glucagon. *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 4747.
47. PATCHORNIK (A.), LAWSON (W.B.), GROSS (E.) et WITKOP (B.). — The use of N-bromosuccinimide and N-bromacetamide for the selective cleavage of C-tryptophyl peptide bonds in model peptides and glucagon. *J. Am. Chem. Soc.*, 82 (1960) 5923.
48. RAMACHANDRAN (L.K.) et WITKOP (B.). — Selective cleavage of C-tryptophyl peptide bonds in proteins and peptides. *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 4028.
49. PETERS (T. Jr.). — Appearance of new N-terminal residues upon treatment of human and bovine serum albumin with N-bromosuccinimide. *C.R. Trav. Lab. Carlsberg*, 31 (1959) 227.
50. QUIOCHO (F.A.), O'DELL (M.) et FRIEDBERG (F.). — N-bromosuccinimide action on creatin phosphokinase. *Experientia*, 17 (1961) 217.
51. SHALTIEL (S.H.) et PATCHORNIK (A.). — The cleavage of histidyl peptides by means of brominating agents. *Bull. Research Council Israël*, 10 A (1961) 48.
52. WILCHEK (M.) et PATCHORNIK (A.). — The chemical cleavage of phenylalanyl peptide bonds. *Bull. Research Council Israël*, 11 A (1962) 82.
53. WITKOP (B.). — Nonenzymatic methods for the preferential and selective cleavage and modification of proteins. *Adv. Protein Chemistry*, 16 (1961) 221.
54. WONG (R.C.) et LIENER (I.E.). — Active and inactive modifications of trypsin induced by acetylation. *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 80.
55. JOLLÈS-THAUREAUX (J.). — Structure partielle du lysozyme de blanc d'œuf de poule. *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1957 (R. Foulon, impr.).
56. JOLLÈS (J.) et JOLLÈS (P.). — Structure chimique du lysozyme de blanc d'œuf de poule. *Symp. sul Lisozima di Fleming*, Milan, 1959.
57. ALDERTON (G.), WARD (W.H.) et FEVOLD (H.L.). — Isolation of lysozyme from egg white. *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 43.
58. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of aminoacids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.

59. HUGHES (W.L.), SAROFF (H.A.) et CARNEY (A.L.). — Preparation and properties of serum and plasma proteins. XXII. A crystallizable guanidinated derivative of human serumalbumin. *J. Am. Chem. Soc.*, 71 (1949) 2476.
60. SCOTT (F.L.), O'DONOVAN (D.G.) et REILLY (J.). — Studies in the pyrazole series. III. Substituted guanidines. *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4053.
61. BANNARD (A.). — *Canad. J. Chem.*, 36 (1958) 1541.
62. JOLLÈS (P.) et JOLLÈS (J.). — Structure du lysozyme de blanc d'œuf de poule. Réduction du lysozyme et études des peptides de l'hydrolysats tryptique du lysozyme réduit. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 1933.
63. MUELER (J.M.), PIERCE (J.G.), DAVOLL (H.) et VIGNEAUD (V. DU). — The oxidation of oxytocin with performic acid. *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 309.
64. LUDOWIEG (J.) et DORFMAN (A.). — A micromethod for the colorimetric determination of N-acetyl groups in acid mucopolysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 212.
65. ACHER (R.) et CROCKER (C.). — Réactions colorées spécifiques de l'arginine et de la tyrosine réalisées après chromatographie sur papier. *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 704.
66. BIZERTE (G.) et OSTEUX (R.). — La chromatographie de partage sur papier des dinitrophénylaminoacides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 50.
67. ROVERY (M.) et FABRE (C.). — Chromatographie sur papier en phase aqueuse pour l'étude des dinitrophényl. (DNP) aminoacides et peptides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35 (1953) 54.
68. PAIRENT (F.W.) et WILLIAMSON (M.B.). — A modified two-dimensional paper chromatographic system for the separation of DNP-aminoacids. *J. Chromatog.*, 4 (1960) 80.
69. JOLLÈS (P.). — *Methods in enzymology*, 5 (1961). Academic Press, New York (sous presse).
70. FRAENKEL-CONRAT (H.). — The essential groups of lysozyme, with particular reference to its reaction with iodine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 27 (1950) 109.
71. HIRS (C.H.W.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid oxidized ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 623.
72. RUDLOFF (V.) et BRAUNITZER (G.). — Ueber Hämoglobine VI. Ein Verfahren zur präparativen Gewinnung natürlicher Peptide. Die Isolierung der tryptischen Spaltprodukte von Humanhämoglobin A über Dowex 1 $\times$ 2 unter Verwendung ninhydrinnegativer flüchtiger Puffer. *Z. Physiol. Chem.*, 323 (1961) 129.
73. PORATH (G.) et FLODIN (P.). — Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature*, 183 (1959) 1657.

74. HANSON (L.A.) et JOHANSON (B.G.). — Presence of immunologically active fragments after proteolytic degradation of human γ -globulin. *Nature*, 187 (1960) 559.
75. KUNKEL (H.G.) et TISELIUS (A.). — *J. Gen. Physiol.*, 35 (1951) 89.
76. RYLE (A.P.), SANGER (F.), SMITH (I.F.) et KITAI (R.). — The disulphide bonds of insulin. *Biochem. J.*, 60 (1955) 541.
77. SANGER (F.) et TUPPY (H.). — The aminoacid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 1. The identification of lower peptides from partial hydrolyzates. *Biochem. J.*, 49 (1951) 463.
78. TOENNIS (G.) et KOLB (J.J.). — *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
79. DALGLIESH (C.E.). — The relation between pyridoxin and tryptophan metabolism studied in the rat. *Biochem. J.*, 52 (1952) 3.
80. ACHER (R.) et FROMAGEOT (C.). — Séparation chromatographique d'acides aminés et de peptides V. Les acides aminés individuels de l'insuline avec une note sur le dosage de la proline. *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
81. JOLLÈS (P.) et JOLLÈS (J.). — Hydrolyse trypsique du lysozyme de blanc d'œuf de poule réduit : isolement de peptides contenant du tryptophane et de la cystine. *C.R. Acad. Sci.*, 246 (1958) 1109.
82. Mc FARREN (E.F.). — *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
83. PIEZ (K.A.) et MORRIS (L.). — A modified procedure for the automatic analysis of aminoacids. *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 187.
84. JOLLÈS (J.), JOLLÈS (P.) et JAUREGUI-ADELL (J.). — Etablissement d'une formule provisoire du lysozyme de blanc d'œuf de poule. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 42 (1960), 1319.
85. JOLLÈS-THAUREAUX (J.), JOLLÈS (P.) et FROMAGEOT (C.). — Structure du lysozyme de blanc d'œuf de poule. Etude des peptides de l'hydrolysate trypsique. *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 298.
86. JOLLÈS (P.), THAUREAUX (J.) et FROMAGEOT (C.). — L'enchaînement C-terminal du lysozyme d'œuf de poule. *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 290.
87. JOLLÈS (P.), JOLLÈS (J.) et JAUREGUI-ADELL (J.). — Structure chimique du lysozyme de blanc d'œuf de poule. *Symp. sul Lisozima di Fleming*, Milan, 1961, p. 71/I.
88. PATCHORNIK (A.), SOKOLOVSKI (M.) et SADEK (T.). — *Intern. Congress Biochem.*, V^e Congress Moscou (1961) Abstr. p. 11 et V^e European Peptide Symp., Oxford, septembre 1962.
89. VISWANATHA (T.), LAWSON (W.D.) et WITKOP (B.). — The action of N-bromosuccinimide on trypsinogen and its derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, 40 (1960) 216.

90. VISWANATHA (T.) et LAWSON (W.D.). — The action of N-bromosuccinimide on chymotrypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93 (1961) 128.
 91. WEIL (L.), BUCHERT (A.R.) et MAHER (J.). — Photooxidation of cristallin lysozyme in the pressence of methylen blue and its relation to enzymatic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 40 (1952) 245.
 92. SHUGAR (D.). — Photosensibilisation des enzymes et des dérivés indoliques par la riboflavine. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 33 (1951) 710.
 93. RAO (R.) et RAMACHANDRAN (L.K.). — The role of tryptophan residues in the enzymic activity of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 59 (1962) 507.
 94. ALAIS (C.). — Etude de l'action enzymatique de la présure sur la caséine. Isolement et composition du caséino-glycopeptide. *Thèse Ingénieur-Docteur*, Paris, 1962.
 95. JOLLÈS (P.), ALAIS (C.) et JOLLÈS (J.). — Aminoacid composition of κ -casein and terminal aminoacids of κ - and para- κ -casein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 98 (1962) 56.
 96. WAKE (R.G.). — *Australian J. Biol. Sci.*, 12 (1959) 538.
 97. SPIES (J.R.) et CHAMBERS (C.). — *Anal. Chem.*, 21 (1949) 1249.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
------------------------	---

Première partie

METHODES

Chapitre I. — PRÉPARATION DES DIVERS DÉRIVÉS MODIFIÉS	13
1. — Désamination	13
2. — Guanidination	14
3. — Acétylation	15
4. — Réduction des ponts disulfures	16
5. — Oxydation par l'acide performique	17
Chapitre II. — ETUDE GÉNÉRALE ET COMPARATIVE DES DIVERS DÉRIVÉS MODIFIÉS .	18
1. — Spectres ultraviolets	18
2. — Etude de la valeur de l'azote aminé par dosage à la ninhydrine . .	18
3. — Etude du comportement des dérivés modifiés au cours de l'hydro- lyse trypsique	19
4. — Détermination des groupements acétyles	20
Chapitre III. — ETUDE DE L'ACTION DU N-BROMOSUCCINIMIDE SUR LES PROTÉINES .	22
1. — Méthodes utilisées pour la mise au point des conditions optimales pour la réaction	22
2. — Mise en évidence des nouveaux groupes n-terminaux formés après action du NBS	23
3. — Mesure de l'activité lysante du lysozyme	26
Chapitre IV. — DÉGRADATION SPÉCIFIQUE DES PROTÉINES PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE	27
1. — Hydrolyse trypsique	27
2. — Hydrolyse chymotrypsique	27
3. — Action de la carboxypeptidase	28

Chapitre V. — SÉPARATION D'UN MÉLANGE DE PEPTIDES	29
1. — Chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions	29
1) <i>Chromatographie sur Dowex 50 × 2</i>	29
2) <i>Chromatographie sur Dowex 1 × 2</i>	30
2. — Filtration sur Sephadex	31
3. — Dialyse fractionnée	32
4. — Dessalification des peptides	32
5. — Purification des peptides	33
1) <i>Chromatographie préparative sur papier</i>	33
2) <i>Ionophorèse préparative sur papier</i>	33
Chapitre VI. — ANALYSE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES PEPTIDES	35
1. — Chromatographie sur papier	35
2. — Chromatographie sur colonne	36

Deuxième partie

EXPOSE DES RESULTATS

A — Modifications par voie chimique : application au lysozyme	39
Chapitre I. — LYSOZYME DÉAMINÉ	40
1. — Spectre ultraviolet	40
2. — Etude de la valeur de l'azote aminé par dosage à la ninhydrine	40
3. — Comportement à l'hydrolyse trypsique	42
Chapitre II. — LYSOZYME GUANIDINÉ	43
1. — Spectre ultraviolet	43
2. — Evaluation du pourcentage de guanidination par la méthode de Sanger	43
3. — Comportement à l'hydrolyse trypsique	45
Chapitre III. — LYSOZYME ACÉTYLÉ	46
1. — Spectre ultraviolet	46
2. — Etude de la valeur de l'azote aminé par dosage à la ninhydrine	46
3. — Comportement à l'hydrolyse trypsique	48
Chapitre IV. — COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS AVEC LES TROIS LYSOZYMES MODIFIÉS	49

Chapitre V. — LES PEPTIDES (« UNITÉS TRYPSIQUES ») OBTENUS APRÈS HYDRO- LYSE TRYPSIQUE DU LYSOZYME ACÉTYLÉ	51
1. — Première acétylation	51
2. — Deuxième acétylation	57
3. — Troisième acétylation	63
Chapitre VI. — COMPARAISON DE CES RÉSULTATS AVEC CEUX OBTENUS GRACE AUX MÉTHODES CLASSIQUES ET CONCLUSIONS	65
B. — Etude de la coupure spécifique des protéines par voie chimique au niveau des résidus de tryptophane	66
Chapitre I. — APPLICATION AU LYSOZYME	67
1. — Détermination du milieu réactionnel	67
2. — Caractérisation des liaisons rompues: Apparition de nouveaux acides aminés n-terminaux	69
3. — Essais de séparation et d'analyse des peptides formés après action du NBS	71
1) <i>Chromatographie sur Dowex 50 × 2</i>	71
2) <i>Filtration sur Sephadex</i>	73
3) <i>Dialyse fractionnée</i>	76
4. — Modification du spectre ultraviolet du lysozyme après action du NBS	79
5. — Répercussion de l'action du NBS sur l'activité lysante du lysozyme	82
6. — Répercussion de l'action du NBS sur les acides aminés autres que le tryptophane	82
Chapitre II. — APPLICATION A LA CASÉINE KAPPA	85
1. — Données générales sur la caséine kappa	85
2. — Les nouveaux résidus n-terminaux apparus après action du NBS	86
Chapitre III. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PRODUITS DE DÉGRADATION DU TRYPTOPHANE FORMÉS PAR ACTION DU N-BROMOSUCCINIMIDE	88
Chapitre IV. — DISCUSSION DE L'UTILITÉ DE LA MÉTHODE DANS L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE DES PROTÉINES ET CONCLUSIONS	92
RESUME	95
BIBLIOGRAPHIE	99

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**Comparaison critique
des méthodes d'analyse récentes des acides aminés**

Vu et approuvé :

Paris, le 31 janvier 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

JEAN ROCHE

